

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Estudio microbiológico y epidemiológico de enterobacterias
productoras de carbapenemasas de tipo VIM y OXA-48**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Desirée Gijón Cordero

Directores

**Rafael Cantón Moreno
Patricia Ruiz Carbajosa**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGIA



TESIS DOCTORAL

**Estudio microbiológico y epidemiológico de enterobacterias productoras
de carbapenemasas de tipo VIM y OXA-48**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Desirée Gijón Cordero

DIRECTORES

Rafael Cantón Moreno
Patricia Ruíz Garbajosa

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología y Parasitología



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y EPIDEMIOLÓGICO DE ENTEROBACTERIAS
PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS DE TIPO VIM Y OXA-48**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

DESIRÈE GIJÓN CORDERO

DIRECTORES

Dr. Rafael Cantón Moreno

Dra. Patricia Ruíz Garbajosa

Madrid, 2019

El Dr. Rafael Cantón Moreno, Jefe de Servicio del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS).

La Dra. Patricia Ruiz Garbajosa, Facultativo Especialista de Área del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS).

CERTIFICAN QUE:

DESIRÉE GIJÓN CORDERO ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid-IRYCIS, bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor, con el título:

“Estudio microbiológico y epidemiológico de enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo VIM y OXA-48”

Y para que así conste, firmamos la presente certificación en Madrid a 10 de julio de 2019

Fdo.:

Fdo.:

Dr. Rafael Cantón Moreno

Dra. Patricia Ruiz Garbajosa



H2020-SMEInst-2-2016-2017

Nº expediente: CM12/00146



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Desirée Gijón Cordero,
estudiante en el Programa de Doctorado Microbiología y Parasitología,
de la Facultad de Farmacia ☒ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Estudio microbiológico y epidemiológico de enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo VIM y OXA-48

y dirigida por: Rafael Cantón Moreno y Patricia Ruíz Garbajosa

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 10 ☒ de julio ☒ de 2019 ☒

Fdo.: 

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

A Sergio
A Desirée
A Rodrigo

Todas las etapas por las que pasamos a lo largo de nuestra vida tienen su principio y su fin. Hoy termina una de las etapas más importantes de mi vida en la que he crecido tanto a nivel profesional como personal. Durante este largo camino me han acompañado muchas personas, no me gustaría dejarme a nadie atrás, hemos formado una gran familia y nos hemos apoyado tanto en los buenos como en los malos momentos.

Al Dr. Rafael Cantón, gracias por haber confiado en mí, por haberme dado la oportunidad de trabajar a tu lado, por haber sabido transmitir tus conocimientos y por estar siempre ahí, a veces como un padre más que como un jefe.

Gracias a la Dra. Patricia Ruíz Garbajosa por la paciencia durante este largo camino y por haberme guiado en él, por haberme enseñado a ver las cosas de otra forma y por el esfuerzo realizado.

Gracias a Ana Sofía, Irene Rodríguez y Arancha por haberme ayudado en todos los momentos clave de este camino. Siempre dispuestas a echarme una mano y siempre con una sonrisa en la cara. Sin vosotras este trabajo no sería lo que es.

Gracias a todos mis compañeros residentes, Raquel, Luis, José M^a, Juanma, Gustavo, Bea, Beatriz Rguez-Arbolea, Claudio, Ana Luisa, Adriana, María Bordallo, Lorena y Rubén por haber compartido conmigo estos años tan maravillosos. Gracias a Mario por haberme transmitido su experiencia y por todos los consejos durante los desayunos, has sido un referente para mí.

Gracias a Ana “rizos” por su optimismo, por saber decir las palabras adecuadas cuando se necesitan, por estar siempre dispuesta a ayudar a los demás y simplemente por estar ahí. Te quiero.

Gracias a María “turqui” por ser una gran compañera, por haberme transmitido sus conocimientos y sobre todo por ser una gran amiga. No cambies nunca.

Gracias a Juande e Irene por formar parte de mi camino. Sois grandes amigos y siempre os llevaré en mi corazón.

Gracias a María Gálvez por ofrecerse a velar por nosotros, por ser nuestra “madre” y por transmitirnos esa vitalidad tan suya. Te quiero.

Gracias a todos los adjuntos del Servicio que me han formado, especialmente a Marisa Morosini, María Meseguer y Enrique Gómez Mampaso, gracias por transmitir día a día la ilusión por el trabajo bien hecho. Y también gracias a Maribel y a todos los técnicos del Servicio.

Por supuesto gracias a todos los que están y estuvieron en la parte de investigación, especialmente a Marta, María (“galleta”), Blanca, Laura, Conchi y Ainhize. Gracias por estar siempre ahí, por compartir conmigo tan buenos momentos (y no tan buenos), por hacer las cosas un poco más fáciles y por ser tan buenas amigas. Os quiero.

Gracias a Esther, por saber escuchar, por ayudar siempre a los demás con una sonrisa y por sus buenos consejos y sus abrazos “curativos”.

Gracias a todo el Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal por recibir a todos los residentes con los brazos abiertos, por estar con nosotros al principio de nuestra aventura y por hacer que nos sintamos como en casa.

Gracias a mis suegros por acogerme en su familia como a una hija, porque el vínculo que une a una verdadera familia no es de sangre, sino de alegría, compromiso, confianza y respeto mutuo. Gracias por vuestra generosidad, cariño y apoyo incondicional.

Gracias a mi tía, por estar dispuesta a velar por mí, por enseñarme y guiarme en la vida y por cuidarme como si fuera su hija. Te quiero.

Gracias a mis padres, por hacer que sea como soy, por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada momento, porque la vida no viene con manual de instrucciones, viene con unos padres, en definitiva GRACIAS POR TODO. Gracias también a mis hermanos, por apoyarme, estar siempre cuando los necesito y por cuidar de mí. Os quiero mucho.

Finalmente, gracias a los pilares fundamentales de mi vida. A Sergio, por estar siempre a mi lado, apoyarme en todos los momentos, sobre todo en este duro camino que ha sido la tesis, gracias por haber hecho que fuera posible, gracias por hacer siempre las cosas más fáciles y gracias por TODO. A Desirée y Rodrigo, gracias por sacar una sonrisa en cada momento, por hacer que los problemas sean menos importantes estando a vuestro lado y porque a vuestra manera también cuidáis de mí. Sois lo mejor que me ha pasado en la vida. A los tres, gracias por ser la luz que guía mi camino. ¡OS QUIERO!

Desirée

ÍNDICE

Listado de figuras	1
Listado de tablas	5
Listado de abreviaturas	7
RESUMEN	11
SUMMARY	15
INTRODUCCIÓN	19
1. Relevancia de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en el sistema sanitario	21
2. Clasificación, origen y evolución de las carbapenemasas.....	22
2.1 Carbapenemasas de clase A	22
2.2 Carbapenemasas de clase B	24
2.3 Carbapenemasas de clase D	26
3. Epidemiología y diseminación de carbapenemasas	27
3.1 Epidemiología de las carbapenemasas de clase A.....	27
3.2 Epidemiología de las metalo-betalactamasas.....	29
3.3 Epidemiología de las carbapenemasas de tipo OXA-48.....	30
4. Importancia de los plásmidos, integrones y de los clones de alto riesgo en la persistencia y diseminación de las enterobacterias productoras de carbapenemasas.....	31
5. Asociación de las carbapenemasas con otros mecanismos de resistencia ...	34
6. Carbapenemasas en España.....	38
7. Calorimetría aplicada a la determinación de la sensibilidad antibiótica	40
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	43
MATERIAL Y MÉTODOS	47
1. Muestras para el aislamiento de enterobacterias productoras de carbapenemasas.....	49
1.1 Muestras de heces de pacientes portadores.....	49
1.2 Aislados clínicos de enterobacterias productoras de carbapenemasas.....	49
2. Procesamiento de las muestras	50
3. Identificación bacteriana y perfil de sensibilidad a antimicrobianos.....	50
4. Detección fenotípica de la producción de carbapenemasas y de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).	52
4.1 Detección fenotípica de la producción de carbapenemasas.....	52
4.2 Detección fenotípica de la producción de BLEE.....	54
5. Extracción de ADN	55
5.1 Separación de ADN y visualización	56
5.2 Purificación y secuenciación de ADN	58

6.	Caracterización de los genes <i>bla</i> _{BLEE} y <i>bla</i> _{carbapenemasa}	58
7.	Caracterización de los entornos genéticos de <i>bla</i> _{VIM}	58
8.	Caracterización plasmídica	61
8.1	Transferencia de los genes <i>bla</i> _{carbapenemasa}	62
8.2	Localización de los genes <i>bla</i> _{BLEE} y <i>bla</i> _{carbapenemasa}	68
8.3	Secuenciación del plásmido pRYC-OXA-48	68
9.	Estructura poblacional	69
9.1	Electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE)	69
9.2	Multilocus sequence typing (MLST)	69
10.	Calorimetría (calScreener®).....	72
10.1	Microorganismos estudiados	73
10.2	Antimicrobianos empleados.....	73
10.3	Microdilución estándar y preparación del inóculo	73
10.4	Determinación de los valores de CMI con el sistema calScreener®	75
10.5	Análisis de los resultados de CMI	79
10.6	Estudio de sinergia mediante la técnica de tablero de ajedrez	79
10.7	Estudio de sinergia con el sistema calScreener®.....	80
10.8	Análisis de los resultados de sinergia	81
	RESULTADOS	83
1.	Estudio de vigilancia epidemiológica de carbapenemasas	85
1.1	Prevalencia de portadores fecales y caracterización de carbapenemasas.....	85
1.2	Perfil de sensibilidad	89
1.3	Estructura poblacional.....	90
1.4	Entorno genético del gen <i>bla</i> _{VIM-1} y caracterización de los plásmidos.	90
2.	<i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> productores de VIM-1 en el Hospital Ramón y Cajal (período 2008-2013).....	90
2.1	Características de los pacientes.....	91
2.2	Caracterización de carbapenemasas	93
2.3	Perfil de sensibilidad	94
2.4	Estructura poblacional.....	98
2.5	Análisis de los plásmidos portadores de <i>bla</i> _{VIM-1}	98
3.	Estudio de aislados clínicos productores de OXA-48.....	101
3.1	Características de los pacientes.....	101
3.2	Caracterización de OXA-48.....	105
3.3	Perfil de sensibilidad	105
3.4	Estructura poblacional.....	106

3.5	Localización del gen <i>bla</i> _{carbapenemasa} y tipado del plásmido.....	107
3.6	Secuenciación del plásmido pRYC-OXA-48	109
4.	Estudio de sensibilidad mediante microcalorimetría isotérmica y ensayo de sinergia	112
4.1	Validación del sistema CalScreener®: Comparación de los valores de CMI obtenidos mediante microdilución en caldo y microcalorimetría isotérmica.....	112
4.2	Características de la determinación de los valores de CMI mediante microcalorimetría isotérmica en cepas multirresistentes	120
4.3	Validación del estudio de sinergia mediante microcalorimetría	124
	DISCUSIÓN	127
1.	Estudio de vigilancia epidemiológica de carbapenemasas	129
2.	<i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> productores de VIM-1 en el Hospital Ramón y Cajal (período 2008-2013).....	133
3.	Estudio de aislados clínicos productores de OXA-48.	136
4.	Estudio de aislados clínicos mediante microcalorimetría isotérmica.....	139
	EPÍLOGO	143
	CONCLUSIONES	147
	BIBLIOGRAFÍA	151
	ANEXOS	173

Listado de figuras

Figura 1: Representación de la distribución global de carbapenemasas (pag. 28).

Figura 2: Representación de la distribución en Europa de carbapenemasas (pag. 28).

Figura 3: Porcentaje de resistencia a antimicrobianos de aislados de *E. coli* del hospital Ramón y Cajal (2008-2016) (pag. 36).

Figura 4: Porcentaje de resistencia a antimicrobianos de aislados de *K. pneumoniae* del hospital Ramón y Cajal (2008-2016) (pag. 36).

Figura 5: Porcentaje de *Enterobacterales* multirresistentes en el programa SENTRY (pag. 37).

Figura 6: Porcentaje de *Enterobacterales* productores de BLEE y resistentes a carbapenems recogidos durante el programa SENTRY (pag. 37).

Figura 7: Representación esquemática del procesamiento de las muestras fecales (pag. 51).

Figura 8: Test de Hodge modificado (pag. 52).

Figura 9: Test CarbaNP (pag. 52).

Figura 10: Doble difusión con discos de carbapenems y EDTA (pag. 53).

Figura 11: Inhibición por la acción del ácido borónico (pag. 53).

Figura 12: Algoritmo para la detección de carbapenemasas (pag. 54).

Figura 13: Método de la doble difusión con discos para inferir la presencia de BLEE (pag. 54).

Figura 14: Calorímetro calScreener® (pag. 72).

Figura 15: A) Transferencia del inóculo bacteriano al vial de plástico. B) Vial de plástico y copa de titanio. C) "CalPlate" (pag. 76).

Figura 16: A) Introducción de calPlate en calScreener®. B) Tecnología calScreener® (pag. 76).

Figura 17: Software CalView para el análisis de los resultados obtenidos con calScreener® (pag. 77).

Figura 18: Prevalencia de portadores fecales de carbapenemasas en 2006 y 2009-2010 (pag. 85).

Figura 19: eBurst de *K. pneumoniae*. Se observa el CC23 donde están incluidas la mayoría de las STs encontradas en nuestro trabajo (pag. 91).

Figura 20: Integrines de clase 1 portadores del gen *bla_{VIM-1}* (pag. 91).

Figura 21: Número de pacientes infectados o colonizados por enterobacterias productoras de VIM por áreas de hospitalización (pag. 92).

Figura 22: Número de pacientes infectados/colonizados con enterobacterias productoras de VIM-1 (pag. 93).

Figura 23: Porcentaje de resistencia en *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de VIM-1 (pag. 94).

Figura 24: Secuencia temporal de las STs de *K. pneumoniae* (i) y *E. coli* (ii) productores de VIM-1 (pag. 99).

Figura 25: Distribución por Servicios y meses de los aislados productores de OXA-48 (pag. 102).

Figura 26: Aislados con OXA-48 que producen otra carbapenemasa o una BLEE (pag. 105).

Figura 27: Secuencia temporal de las ST de *K. pneumoniae* (i) y *E. coli* (ii) productores de OXA-48 (pag. 106).

Figura 28: Análisis de las secuencias tipo (ST) mediante la plataforma PhyloViz. A/ Relación entre las STs de *K. pneumoniae* y las áreas de hospitalización de los pacientes. B/ Relación entre las STs de *K. pneumoniae* y la producción de VIM-1. C/ Relación entre las STs de *K. pneumoniae* y la producción de CTX-M-15. D/ Relación entre las STs de *E. coli* y las áreas de hospitalización de los pacientes. E/ Relación entre las STs de *E. coli* y la producción de VIM-1. F/ Relación entre las ST de *E. coli* y la producción de CTX-M-15 (pag. 108).

Figura 29: Hibridación *Southern blot* en aislados productores de OXA-48. A/ La sonda utilizada fue OXA-48. B/ La sonda utilizada fue VIM-1 (pag. 108).

Figura 30: RFLP de aislados productores de OXA-48 (pag. 109).

Figura 31: Plásmido pRYC-OXA-48 perteneciente al clon ST11-*K. pneumoniae* (pag. 110).

Figura 32: Comparación, mediante MAUVE (A) y BRIG (B), del plásmido pRYC-OXA-48 con otros plásmidos portadores del gen *bla*_{OXA-48} (pag. 111).

Figura 33: Análisis de Bland-Altman: acuerdo observado representando la diferencia de valores de CMI frente a la media de los valores de CMI obtenidos con los métodos de microcalorimetría isotérmica y microdilución. La línea discontinua representa la tendencia de los puntos obtenidos (pag. 117).

Figura 34: A) Tiempo medio necesario para detectar la CMI de ciprofloxacino en *E. coli*. B) Tiempo medio necesario para detectar la CMI de piperacilina-tazobactam en *E. coli* (pag. 120).

Figura 35: Termograma característico de *E. coli* sin mecanismo de resistencia (MR) y con OXA-48 (pag. 121).

Figura 36: Termograma característico de *K. pneumoniae* sin mecanismo de resistencia (MR), con OXA-48 o con KPC (pag. 122).

Figura 37: Resultados de CMI obtenidos para un aislado de *E. coli* sin ningún mecanismo de resistencia (MR) y con OXA-48 (pag. 123).

Figura 38: Resultados de CMI obtenidos para un aislado de *K. pneumoniae* sin ningún mecanismo de resistencia (MR), con OXA-48 o con KPC (*pag.* 124).

Listado de tablas

Tabla 1: Clasificación de las carbapenemasas de codificación plasmídica (*pag. 23*).

Tabla 2: Epidemiología de las carbapenemasas en España (*pag. 40*).

Tabla 3: Puntos de corte de EUCAST (2014) para carbapenems en Enterobacterias (*pag. 50*).

Tabla 4: Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización de los genes *bla*_{BLEE} (*pag. 59*).

Tabla 5: Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización de los genes *bla*_{carbapenemasa} (*pag. 60*).

Tabla 6: Cebadores utilizados para la caracterización del entorno genético de *bla*_{VIM} (*pag. 61*).

Tabla 7: Caracterización de plásmidos portadores de OXA-48 (*pag. 62*).

Tabla 8: Cebadores y condiciones utilizados para la clasificación de plásmidos (*pag. 63*).

Tabla 9: Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización por MLST de *K. pneumoniae* (*pag. 70*).

Tabla 10: Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización por MLST de *E. coli* (*pag. 71*).

Tabla 11: Cepas de referencia utilizadas en la validación de CalScreener® (*pag. 73*).

Tabla 12: Características de los aislados con algún MR utilizados en CalScreener® (*pag. 74*).

Tabla 13: Diseño de calPlate para los estudios de validación del método y de la CMI (*pag. 75*).

Tabla 14: Diseño de calPlate para los estudios de sinergia antibiótica con amikacina y meropenem (*pag. 80*).

Tabla 15: Diseño de calPlate para los estudios de sinergia antibiótica con colistina y meropenem (*pag. 80*).

Tabla 16: Identificación, frecuencia y caracterización fenotípica de aislados procedentes de 1.100 muestras de heces (*pag. 87*).

Tabla 17: Datos epidemiológicos de aislados de enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo VIM (*pag. 88*).

Tabla 18: CMIs obtenidas mediante tiras en gradiente (Etest) de los aislados productores de VIM-1 (*pag. 89*).

Tabla 19: Datos epidemiológicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de VIM-1 (*pag. 95*).

Tabla 20: Datos epidemiológicos de aislados clínicos productores de OXA-48 (*pag. 103*).

Tabla 21: Valores diagnósticos (%) obtenidos tras la comparación de la microcalorimetría con la microdilución en caldo (*pag.* 112).

Tabla 22: Comparación de las CMI_s obtenidas mediante microdilución en caldo y CalScreener® en los aislados que no presentaron ningún mecanismo de resistencia (*pag.* 113).

Tabla 23: Comparación de las CMI_s obtenidas mediante microdilución en caldo y CalScreener® en los aislados que presentaban algún mecanismo de resistencia (*pag.* 115).

Tabla 24: Valores de concentración inhibitoria fraccionada (Σ FIC) obtenidos por microcalorimetría y por la técnica de tablero de ajedrez en el estudio de sinergia de la combinación meropenem-colistina (*pag.* 125).

Tabla 25: Valores de concentración inhibitoria fraccionada (Σ FIC) obtenidos por microcalorimetría y por la técnica de tablero de ajedrez en el estudio de sinergia de la combinación meropenem-amikacina (*pag.* 126).

Listado de abreviaturas

AC: acuerdo categórico.

ACL: ácido clavulánico.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AE: acuerdo esencial.

Ak: amikacina.

ARN: ácido ribonucleico.

ATM: aztreonam.

AVI: avibactam.

BGNF: bacilo Gram negativo no fermentador.

bla: betalactamasa.

BLEE: betalactamasa de espectro extendido.

CAZ: ceftazidima.

CC: complejo clonal.

CFMBL-A: clon A de *C. freundii*.

CGD: Cirugía General y Digestivo.

CIF: concentración inhibitoria fraccionada.

CMI: concentración mínima inhibitoria.

COL: colistina.

Cp: ciprofloxacino.

Cr: cromosoma.

CTX: cefotaxima.

DDST: test de sinergia de doble disco.

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*.

ECMBL-A: clon A de *E. cloacae*.

ECMBL-B: clon B de *E. cloacae*.

ECOFF: punto de corte epidemiológico.

ECOMBL-A: clon A de *E. coli*.

ECOMBL-B: clon B de *E. coli*.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EG: error grave.

EM: error mayor.

EMe: error menor.

EPC: enterobacterias productoras de carbapenemasas.

ETH: elementos genéticos de transferencia horizontal.

ETP: ertapenem.

FEP: cefepime.

Fm: fosfomicina.

Gm: gentamicina.

I: intermedio.

IMP: imipenem.

Inc: incompatibilidad.

KPMBL-A: clon A de *K. pneumoniae*.

KPMBL-B: clon B de *K. pneumoniae*.

KPMBL-C: clon C de *K. pneumoniae*.

KPMBL-D: clon D de *K. pneumoniae*.

LB: Luria-Bertani.

MBL: metalo-betalactamasa.

MCI: microcalorimetría isotérmica.

MCK: agar MacConkey.

MDC: microdilución en caldo.

MER: meropenem.

MH: Müller-Hinton.

Mn: minociclina.

MR: mecanismo de resistencia.

Na: ácido nalidíxico.

NEG: negativo.

Nf: nitrofurantoína.

NR: no realizado.

NT: no tipable.

Pac: paciente.

PFGE: *pulse field gel electrophoresis*.

PI: plásmido.

PNT: procedimiento normalizado de trabajo.

POS: positivo.

PTZ: piperacilina-tazobactam.

R: resistente.

Rel: relaxasa.

Rep: replicasa.

RFLP: fragmentos de restricción de longitud polimórfica.

S: sensible.

SDS: dodecilsulfato de sodio.

SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

SLV: *single locus variant*.

ST: secuencia tipo.

S/T: sulfametoxazol-trimetoprim.

Tb: tobramicina.

THM: test de Hodge modificado.

UCI: unidad de cuidados intensivos.

UFC: unidades formadoras de colonias.

XDR: extremadamente resistente.

RESUMEN

Introducción: Actualmente, las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria constituyen un importante problema de salud pública, principalmente las causadas por bacterias multirresistentes. Aunque no hay consenso unánime sobre la definición de multirresistencia, se acepta que el término se aplique a aquellas bacterias que son resistentes a dos o más grupos de antimicrobianos utilizados en el tratamiento de pacientes infectados por los microorganismos considerados. Las enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) se clasifican como microorganismos multirresistentes.

La detección de portadores fecales de EPC tiene implicaciones epidemiológicas relevantes, siendo importante identificar el tipo de carbapenemasa y determinar si el gen correspondiente está asociado a integrones y/o se encuentra en elementos móviles, especialmente en transposones y plásmidos. También es importante conocer sus asociaciones con clones de alto riesgo vinculados a epidemias en instituciones sanitarias y responsables de su dispersión global. La caracterización microbiológica es útil para comprender su diseminación e implementar acciones para su control.

Los **objetivos** de nuestro estudio fueron:

1. Evaluar la prevalencia de portadores fecales de EPC en pacientes hospitalizados y no hospitalizados de nuestra área geográfica (Madrid) durante dos períodos (2006 y 2009-2010) en los que nos encontrábamos en una epidemia por aislados productores de enzimas VIM y emergencia de carbapenemasas KPC.
2. Actualizar la epidemiología y caracterización microbiológica de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de carbapenemasas tipo VIM tras el brote descrito en 2005 en nuestro Hospital.
3. Caracterizar el escenario epidemiológico y microbiológico de los primeros aislados de *Enterobacteriales* productores de OXA-48 emergentes en nuestro hospital (2012-2013).
4. Validar la microcalorimetría isotérmica como técnica para estudiar la sensibilidad antimicrobiana en *Enterobacteriales*, incluidos los productores de carbapenemasas.

Resultados: Obtuvimos un total de 14 (1,3%) EPCs pertenecientes a 11 pacientes (1,05%, 11/1043) de 1.100 muestras fecales estudiadas. El porcentaje de portadores fecales de EPC aumentó ligeramente de 2006 (0,7%) a 2009-2010 (1,5%), destacando su aparición en pacientes ambulatorios en el segundo período. En 2006, cuatro aislados presentaron genes *bla*_{VIM-1} y mostraron pulsotipos idénticos a los observados en clones epidémicos detectados previamente en nuestro Hospital en 2005. En el segundo período, diez aislados (6 *K. pneumoniae*, 2 *E. coli*, 1 *Enterobacter cloacae* y 1 *Citrobacter freundii*) tenían el gen *bla*_{VIM-1} y mostraron una alta diversidad clonal. Sin embargo, los estudios de MLST revelaron que la mayoría de los aislados de *K. pneumoniae* pertenecían al complejo clonal (CC)23 y los aislados de *E. coli* pertenecieron al CC155. Los aislados de *E. cloacae* del primer período presentaron el mismo pulsotipo que los descritos durante el brote inicial de 2005 mientras que el aislado de *E. cloacae* del segundo período no tuvo ninguna relación clonal con los anteriores. Los genes *bla*_{VIM-1} se localizaron en integrones de clase 1 (In110 e In113).

Durante período 2008-2013, detectamos 97 aislados productores de VIM-1 con una diversidad clonal relativamente alta, 70 aislados de *K. pneumoniae* se correspondían con 32 pulsotipos y 27 aislados de *E. coli* pertenecían a 25 pulsotipos. Hay que destacar que detectamos los clones de alto riesgo *K. pneumoniae*-ST11 y *E. coli*-ST131. En estos aislados, el gen *bla*_{VIM-1} se localizó en

plásmidos de 50-80 Kb pertenecientes a los grupos IncN, IncHI2 e IncL/M, aunque también se encontraron en plásmidos más grandes (130-290 Kb) pertenecientes a IncL/M, IncN, IncHI2 e IncFIK.

Por otro lado, durante 2012-2013, se recogieron 71 aislados productores de OXA-48 de 57 pacientes (61 *K. pneumoniae*, 5 *E. coli*, 2 *Klebsiella aerogenes* y uno de *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter amalonaticus*). Además de OXA-48, 51 aislados producían también CTX-M-15, 6 aislados producían VIM-1 y CTX-M-15 y un aislado de *E. coli* también producía VIM-1. Los aislados de *K. pneumoniae* se clasificaron en 16 pulsotipos y 7 STs, mientras que los aislados de *E. coli* se clasificaron en 4 pulsotipos y 4 STs. Mediante MLST identificamos genes *bla*_{OXA-48} en los clones de alto riesgo ST11, ST15, ST307 y ST405. Además, *bla*_{OXA-48} se localizó principalmente en plásmidos (≥50 kb) pertenecientes a los grupos IncFIK y/o IncL/M. La secuenciación del genoma completo de la cepa F64-ST11-OXA-48 identificó el gen *bla*_{OXA-48} como parte del transposón Tn1999.2 insertado en el gen *tir* dentro de un plásmido IncL/M de 74,686 pb.

Finalmente, los valores de CMI determinados por microcalorimetría proporcionaron valores de diagnóstico (acuerdos esenciales y categóricos) cercanos al 100% en comparación con los obtenidos con el método estándar de microdilución. En general, no se observaron errores graves ni mayores y los errores menores fueron inferiores al 3%. Los valores de CMI mediante microcalorimetría se obtuvieron en menos de 10 y 13 horas para *K. pneumoniae* y *E. coli*, respectivamente, siendo una técnica útil para determinar el efecto sinérgico cuando se combinan dos antibióticos frente a EPCs.

Conclusiones:

1. Los resultados obtenidos alertan de la posibilidad de encontrar portadores de EPCs que de otra manera no hubieran sido detectados ya que la mayoría de pacientes no presentaron ningún tipo de infección por este tipo de microorganismos y no habían tenido contacto previo con pacientes infectados o colonizados. Además, la diseminación de plásmidos altamente transmisibles que contienen los genes *bla*_{VIM-1} en integrones de clase 1 entre una variedad de clones de diferentes especies ha contribuido potencialmente a la penetración, distribución y mantenimiento temporal de las EPCs, lo que conduce a su endemidad.
2. Nuestros datos sugieren una rápida penetración y distribución de genes *bla*_{carbapenemasas} en clones multirresistentes de *Enterobacterales* después de su aparición en nuestra institución. Con la aparición de *K. pneumoniae*-ST11-ST15-ST307-ST405, destacamos la contribución de los clones de alto riesgo en la diseminación y persistencia de genes de resistencia a antibióticos. Además, describimos la presencia del gen *bla*_{OXA-48} en clones de *E. coli* escasamente descritos. También, la aparición de ST11 en pacientes no hospitalizados destaca las dificultades para prevenir su diseminación a la comunidad.
3. Con respecto a la microcalorimetría isotérmica, concluimos que es un método valioso e innovador para la determinación de los valores de CMI, pudiendo obtener los resultados en un período de tiempo más corto que con el método estándar de microdilución. Es asimismo un método útil para estudiar el efecto de las combinaciones de antibióticos en EPCs.

SUMMARY

Introduction. Currently, infections related to health care system constitute an important public health problem, particularly those caused by multidrug-resistant (MDR) microorganisms. Although there is no consensus on the MDR definition, it is generally accepted that the term be applied to those bacteria that are non-susceptible to at least two or more antimicrobial categories used in the treatment of patients infected by the microorganisms considered. Carbapenemase producing *Enterobacterales* (CPE) are classified as MDR pathogens.

Detection of CPE carriers has relevant epidemiological implications, being also important to identify the carbapenemase type and to determine if the corresponding gene is associated with integrons and/or located in mobile elements, especially in transposons and plasmids. It is also relevant to know their associations with high-risk clones linked to epidemics in health institutions and responsible for their global dissemination. The knowledge of these microbiological features is useful to understand their dissemination and to implement actions for their control.

The **objectives** of our study were:

1. To evaluate the prevalence of intestinal colonization with CPE in hospitalized and non-hospitalized patients from our geographic area (Madrid) during two different periods (2006 and 2009-2010) in which we suffered an epidemic situation involving VIM enzymes and the emergence of KPC carbapenemases.
2. To update the on-going epidemiology of VIM-carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates since their description in 2005 in our institution.
3. To characterize the microbiological epidemiologic scenario, through classical and genomic approaches, of the first OXA-48-producing *Enterobacterales* recovered in our hospital (2012-2013).
4. To validate the isothermal microcalorimetry as a technique to determine the antimicrobial susceptibility of *Enterobacterales* isolates, including carbapenemase producers.

Results. Overall, 14 of 1.100 (1.3%) studied fecal samples contained CPE. There was no increase in the frequency of CPE fecal carriers in hospitalized patients when compared 2006 and 2009-2010 periods, but colonization in non-hospitalized patients emerged in the second one. During the first period, four isolates had *bla*_{VIM-1} genes and showed PFGE patterns identical to those observed in VIM-1 epidemic clones previously detected in clinical samples in our institution in 2005. In the second period, ten isolates (6 *K. pneumoniae*, 2 *E. coli*, 1 *Enterobacter cloacae* and 1 *Citrobacter freundii*) harboured *bla*_{VIM-1} and showed a high clonal diversity. Nevertheless, MLST studies revealed that most of the *K. pneumoniae* isolates belonged to clonal complex (CC)23 and *E. coli* isolates belonged to the major CC155. In the first period, VIM-1 *E. cloacae* clones were related to those recovered during the initial outbreak occurred in our institution in 2005 and we found a new *E. cloacae* clone in the second period which was unrelated to the previous ones. The *bla*_{VIM-1} genes were located within class 1 integrons (In110 and In113).

During the follow-up of CPE in our Hospital from 2008 to 2013, we detected 97 producing VIM-1 isolates which presented a relatively high clonal diversity, 70 *K. pneumoniae* isolates corresponded to 32 PFGE types and 27 *E. coli* isolates belonged to 25 PFGE types. It is of note that we detected high-risk clones such as *K. pneumoniae*-ST11 and *E. coli*-ST131. In these isolates, *bla*_{VIM-1} was located on plasmid ranging from 50 to 80 Kb that belonged to IncN, IncHI2 and IncL/M groups, although they were also found in larger plasmids (130-290 Kb) belonging to IncL/M, IncN, IncHI2 and IncFIk groups.

On the other hand, during 2012-2013, 71 OXA-48 producing *Enterobacterales* isolates from 57 patients were recovered (61 *K. pneumoniae*, 5 *E. coli*, 2 *Klebsiella aerogenes* and one each *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter amalonaticus*). Apart from OXA-48 enzyme, 51 isolates co-produced CTX-M-15, 6 isolates co-produced VIM-1 and CTX-M-15 and one *E. coli* isolate also co-produced VIM-1. *K. pneumoniae* isolates were classified in 16 PFGE-types and 7 ST, while *E. coli* isolates were classified in 4 PFGE types and 4 STs. Clonal relatedness revealed that *bla*_{OXA-48} genes were located in high risk clones such as ST11, ST15, ST307 and ST405. The *bla*_{OXA-48} gene was mainly located in plasmids (≥ 50 kb) belonging to IncFIIk and/or IncL/M groups. Using a whole genome sequencing approach, the *bla*_{OXA-48} gene was identified in the strain F64-ST11-OXA-48 as part of the Tn1999.2 transposon inserted at *tir* gene within an IncL/M plasmid of 74,686 bp.

Finally, MIC values determined by microcalorimetry provided diagnostic values (essential and categorical agreements) close to 100% when compared with those obtained with standard microdilution method. Overall, very major errors and major errors were not observed and minor errors were less than 3%. Microcalorimetry MIC results were obtained in less than 10 and 13 h for *K. pneumoniae* and *E. coli*, respectively, being also useful to determine synergy effect when combined two antibiotics against CPE.

Conclusions:

1. These results are an alert for hidden fecal carriage with CPE in patients that otherwise would have not been detected, as most of them were not infected with these organisms and had no demonstrated contact with infected or colonized patients. Moreover, the dissemination of highly transferable plasmids containing *bla*_{VIM-1}-class 1 integrons among a variety of clones of different species has potentially contributed to the penetration, spread, and maintenance of CPE over time, leading to endemicity.
2. Our data suggest a rapid penetration and spread of *bla*_{carbapenemase} genes in multiresistant clones of *Enterobacterales* after their emergence in our institution. With the appearance of *K. pneumoniae*-ST11-ST15-ST307-ST405 clones, we highlight the contribution of high-risk clones in the dissemination and persistence of antibiotic resistance genes. In addition, we describe the presence of *bla*_{OXA-48} gen in poorly described *E. coli* clones. Moreover, emergence of multi-drug resistant (MDR) ST11 among non-hospitalized patients highlights the difficulties in preventing their dissemination into the community.
3. Regarding to the isothermal microcalorimetry (IMC), we conclude that it is a valuable and innovative method for the determination of MIC values, being able to obtain the results in a shorter period of time than with the standard microdilution method. Above all, it is also a useful technique method to test antibiotic combinations in EPC isolates.

INTRODUCCIÓN

“Siempre parece imposible hasta que se hace”

Nelson Mandela

1. Relevancia de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en el sistema sanitario

Actualmente, las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria constituyen un importante problema sanitario, teniendo mayor relevancia las infecciones causadas por bacterias multirresistentes ¹. Aunque no hay un consenso universal sobre la definición de bacteria multirresistente, se sugiere y acepta en general que el término se aplique a aquellos microorganismos que son resistentes a dos o más grupos de antimicrobianos utilizados en el tratamiento de los pacientes infectados por el microorganismo considerado y que esta resistencia tenga relevancia clínica ².

Los fallos terapéuticos debidos a bacterias multirresistentes se están convirtiendo en un problema cada vez más frecuente tanto en los hospitales como en la comunidad. Se estima que 25.000 pacientes en Europa y 23.000 en los Estados Unidos mueren cada año a causa de infecciones causadas por bacterias multirresistentes

(https://seimc.org/contenidos/inf_institucional/recomendacionesinstitucionales/seimc-rc-2014-Declaracion_Waar-en.pdf). Recientemente la Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) ha publicado un registro hospitalario de pacientes afectados por las resistencias bacterianas en España. Este estudio estimó que el número de pacientes con infecciones por bacilos Gram negativos multirresistentes durante 2018 en España sería de 180.600 y el número de fallecidos de 35.400 ³. El coste que conlleva la resistencia antibiótica es muy elevado ya que las infecciones causadas por este tipo de microorganismos tienen peores resultados clínicos, prolongan la estancia hospitalaria y la tasa de mortalidad es elevada con respecto a la misma infección producida por un microorganismo sensible.

La multirresistencia aparece como consecuencia de la presencia de determinantes genéticos de resistencia codificados a nivel del cromosoma o localizados en elementos genéticos de transferencia horizontal (ETH) y cuya expresión se traduce en una ausencia del efecto inhibitorio o letal de los antimicrobianos ⁴. Los ETH puede incrementar la gravedad del problema, ya que su diseminación a otras bacterias sensibles o incluso a otras con resistencia a los antimicrobianos aumenta el perfil de multirresistencia y favorece la aparición de brotes epidémicos, sobre todo en ambientes con gran densidad de selección como son los hospitales ⁵.

En este estudio se abordará la detección y estudio de enterobacterias con resistencia a los carbapenems como consecuencia de la producción de carbapenemasas. La caracterización microbiológica de las enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) tiene implicaciones epidemiológicas, siendo importante identificar el tipo de enzima y determinar si el gen correspondiente está asociado a integrones y localizado en elementos móviles, en especial transposones y plásmidos. Asimismo, es importante conocer su asociación con los denominados clones de alto riesgo, ligados a epidemias en las instituciones sanitarias y responsable de su diseminación mundial ⁶. Su conocimiento podría ser igualmente útil en el control de las infecciones asociadas a las instituciones sanitarias.

2. Clasificación, origen y evolución de las carbapenemasas

En la clasificación funcional de las betalactamasas, las carbapenemasas se encuadran dentro de los grupos 2f y 3⁷. Estas enzimas se clasifican a su vez en clases moleculares en función de su centro activo y estas a su vez en función de la secuencia de aminoácidos. Las clases moleculares A, C y D comprenden betalactamasas con serina en su centro activo; mientras que las de clase B son metaloenzimas que requieren zinc para ejercer su acción hidrolítica. En la tabla 1 se resumen las principales carbapenemasas de codificación plasmídica. Pertenecen a las clases A, B y D ya que con la excepción de CMY-10 (enzima cefalosporinasa con ligera actividad frente a carbapenems), no existen enzimas de clase C (AmpC) capaces de hidrolizar carbapenems. No obstante, los valores de CMI a los carbapenems pueden elevarse en los microorganismos que presentan hiperproducción de betalactamasas de tipo AmpC asociada con defectos de permeabilidad o hiperexpresión de sistemas de expulsión.

2.1 Carbapenemasas de clase A

Las carbapenemasas de clase A se caracterizan por presentar sensibilidad disminuida a los carbapenems (imipenem, meropenem y ertapenem), confiriendo unas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) variables que pueden oscilar entre valores por debajo del punto de corte de sensibilidad y muy superiores al de resistencia. En este grupo se incluyen las enzimas NMC/IMI y SME, de codificación cromosómica, y las KPC, de codificación plasmídica^{8,9}. Todas tienen la capacidad de hidrolizar una gran variedad de antibióticos betalactámicos, incluidos los carbapenems, cefalosporinas, penicilinas y el aztreonam; y todas son mínimamente inhibidas por el ácido clavulánico y en mucha menor medida el tazobactam. Asimismo, son inhibidas por avibactam, relebactam y vaborbactam¹⁰.

La primera carbapenemasa de este grupo (NmcA; *non-metallo-carbapenemase of class A*) se identificó hace más de 20 años en un aislado de *Enterobacter cloacae*. Desde entonces, las enzimas de tipo SME (*Serratia marcescens enzymes*) se han encontrado en aislados de *Serratia marcescens*. Esta familia incluye cinco variantes de codificación cromosómica¹¹ y se han encontrado esporádicamente en los Estados Unidos y en Canadá^{12,13}.

Las enzimas de tipo IMI (*imipenem-hydrolysing β -lactamases*) se han detectado de manera aislada en diferentes países entre ellos los Estados Unidos¹⁴, Francia¹⁵, Croacia¹⁶, Finlandia¹⁷ y Argentina¹⁸ en la mayoría de las ocasiones en cepas de *Enterobacter* spp. Mayoritariamente son de codificación cromosómica, limitándose así su expresión y su diseminación. Sin embargo, la variante IMI-2 se ha identificado en una cepa ambiental de *Enterobacter asburiae* con una localización plasmídica¹⁹.

Tabla 1. Clasificación de las carbapenemasas de codificación plasmídica (adaptado y actualizado de Bush y Jacoby, 2010).

Clase molecular ^a (grupo funcional ^b)	Enzimas	Inhibición por				Microorganismos	Localización del gen	Importancia epidemiológica
		ACL	EDTA	AVI	ATM			
A (2f)	Sme-1 a Sme-3, IMI-1 a IMI-3, Nmca	±	-	+	R	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	Cr	±
	KPC-2 ^c a KPC-13	±	-	+	R	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>	PI	++++
B (3)	GES-1 a GES-20	+	-	-	S/R	<i>Enterobacteriales</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	PI	+
	IMP-1 a IMP-33, VIM-1 a VIM-33, NDM 1 a NDM-6, SPM-1, SIM, GIM, IND-1 a IND-7, AIM, DIM, KHM	-	+	-	S	<i>Enterobacteriales</i> , <i>P. aeruginosa</i> y otros BGNF	PL/Cr	±/+++
D (2DF) ^d	Grupo OXA-23 (OXA-23, OXA-27, OXA-49)	±	- ^e	-	-	<i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriales</i>	PI/Cr	++
	Grupo OXA-24 (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72)			-	-			
	Grupo OXA-40 (OXA-40, OXA-143)			-	S			
	OXA-58			-	-			
	Grupo OXA-48 (OXA-48, OXA-54, OXA-181)			+	-			

ATM, aztreonam; Cr, cromosoma; ACL, ácido clavulánico; AVI, avibactam; BGNF, bacilo Gram negativo no fermentador; PI, plásmido; R, resistente; S, sensible.

^aClasificación de Ambler; ^bClasificación de Bush, Jacoby y Madeiros; ^cKPC-1 se identificó después de KPC-2; ^dSolo se han incluido las carbapenemasas de clase D representativas de cada grupo; ^eAlgunas enzimas tipo OXA se pueden inhibir débilmente por EDTA.

La primera variante de la familia GES (*Guiana extended-spectrum β -lactamase*) se describió en el año 2000 pero no se consideró una carbapenemasa. Este grupo incluye 40 variantes con la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro ²⁰. Sin embargo, de todas las variantes, GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14 y GES-18 hidrolizan imipenem de manera eficaz ²¹. Aunque son poco frecuentes, se han encontrado en todo el mundo. Entre las variantes con actividad carbapenemasa destacan: GES-2, identificada en *Pseudomonas aeruginosa* ²² y GES-5, identificada en *Enterobacterales* y *P. aeruginosa* ^{23,24}. GES-11 y GES-14 solo se han aislado en *Acinetobacter baumannii* ²⁵, y GES-18 se ha encontrado en *P. aeruginosa* pero no se ha aislado en *Enterobacterales* ²⁶.

Las enzimas de tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) son las de mayor importancia epidemiológica y clínica dentro de las carbapenemasas de clase A. Se han detectado principalmente en *K. pneumoniae*, uno de los patógenos nosocomiales más importantes. Suelen conferir altos niveles de resistencia no solo a carbapenems, sino también a la mayoría de los antibióticos betalactámicos, incluyendo las cefalosporinas de amplio espectro. El primer aislado de *K. pneumoniae* productor de KPC se identificó en 1996 en la costa este de los Estados Unidos ²⁷. Desde entonces han ido apareciendo las distintas variantes, actualmente se conocen unas 40 KPC, teniendo todas ellas cambios en la secuencia de aminoácidos. Las cepas productoras de KPC se han detectado por toda Europa. Los aislados iniciales estuvieron vinculados a casos importados desde las zonas endémicas (principalmente Grecia e Italia) ^{28,29}. En la actualidad, se encuentran ampliamente distribuidas ³⁰. Recientemente se han descrito algunas variantes de KPC no inhibidas por el avibactam, de forma que los aislados que las presenta muestran resistencia a la combinación de ceftazidima-avibactam ^{31,32}.

La diseminación de las enzimas tipo KPC en el sudeste asiático no se conoce en detalle, aunque en China se han descrito varias zonas consideradas endémicas ²⁸. En India hay muy pocos casos descritos de aislados productores de KPC ya que en esta zona destacan las enzimas tipo NDM y OXA-48. Cabe reseñar, que la diseminación mundial de los aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC-2 y KPC-3 ha sido consecuencia en la mayoría de las ocasiones debida a la expansión del clon de alto riesgo ST258 ³³. Más recientemente se han encontrado en *P. aeruginosa*, mayoritariamente en Sudamérica ³⁴.

2.2 Carbapenemasas de clase B

Las carbapenemasas de clase B, o metalobetalactamasas (MBL) se caracterizan por ser capaces de hidrolizar carbapenems y por su resistencia a los inhibidores de betalactamasas disponibles comercialmente. Sin embargo, no son capaces de hidrolizar el aztreonam y son sensibles a la inhibición por metales quelantes. Este grupo incluye enzimas tales como VIM, IMP, GIM, SIM y NDM, las cuales están localizadas en su mayoría en integrones. Cuando estos integrones están localizados en transposones y asociados a plásmidos se facilita su diseminación entre diferentes bacterias ³⁵.

Este tipo de enzimas son intrínsecas en distintas especies de bacterias ambientales y oportunistas. Se consideran de adquisición plasmídica desde que se identificaron en *Pseudomonas* spp. o *Enterobacterales* a principios de los 90 ³⁶. Las familias más frecuentes dentro de las MBLs son de transferencia plasmídica e incluyen las de tipo VIM, IMP y NDM, mientras que las de tipo GIM y KHM ^{37,38}

se han encontrado esporádicamente. Aunque se encuentran por todo el mundo, las enterobacterias productoras de VIM son más frecuentes en el sur de Europa y en la cuenca mediterránea, mientras que las de tipo IMP se localizan principalmente en Asia ³⁶.

Las betalactamasas de tipo IMP se han identificado en bacilos Gram negativos como *Enterobacteriales*, *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. Hasta la fecha se conocen al menos 82 variantes distribuidas por todo el mundo, aunque la frecuencia de aislados productores de IMP es mucho menor que los productores de KPC, VIM, NDM u OXA-48. Este tipo de enzimas se localizan principalmente en Japón, Taiwán y el este de China ³⁹⁻⁴¹.

Otro grupo dentro de las MBL son las enzimas tipo VIM. La primera se identificó en Italia en 1997 ^{42,43}. Actualmente se conocen al menos 66, identificadas principalmente en *P. aeruginosa* y *Enterobacteriales*. La más frecuente es VIM-2 ⁴⁴, localizada por todo el mundo aunque con una distribución endémica en el sur de Europa (Grecia, España e Italia) y en el sudeste asiático (Corea del Sur y Taiwán); también ha sido responsable de brotes en África ^{45,46} y algunos países europeos (Alemania y Francia) ^{47,48}. En Europa, Grecia se considera zona endémica de enterobacterias productoras de VIM-1. Existen varios estudios sobre la diseminación de *K. pneumoniae* productora de VIM-1 por todo el país pero también se ha encontrado esta enzima en *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, algunas especies de *Serratia* y en *Klebsiella oxytoca* ^{49,50}.

La betalactamasa de tipo KHM se identificó en Japón en 1997 en un aislado de *C. freundii* ³⁸. La primera GIM se identificó en Alemania en un aislado de *P. aeruginosa* ³⁷, desde entonces se ha identificado también en aislados de *S. marcescens* ⁵¹, *E. cloacae* ⁵² y *Acinetobacter pittii* ⁵³. Más recientemente, se ha encontrado en especies de enterobacterias como *E. coli*, *C. freundii* y *K. oxytoca*. Dentro de las MBLs se incluyen otros grupos como SPM-1 ⁵⁴, SIM-1 ⁵⁵, DIM-1 ⁵⁶, TMB-1 ⁵⁷ y AIM-1 ⁵⁸, las cuales se han encontrado en *Pseudomonas* spp. o *Acinetobacter* spp., hasta el momento no se han identificado en *Enterobacteriales*.

Uno de los grupos con mayor relevancia clínica dentro de las MBLs es el constituido por las enzimas tipo NDM, descrita por primera vez en 2009 en Suecia y aislada de un paciente sueco de origen indio infectado por una cepa de *K. pneumoniae* y otra cepa de *E. coli* que había estado previamente ingresado en un hospital de Nueva Delhi ^{59,60}. NDM se parece poco al resto de las MBLs, solo guarda un 32,4% de similitud aminoacídica con VIM-1/VIM-2. NDM-1 hidroliza penicilinas, cefalosporinas y carbapenems aunque tiene poco efecto sobre aztreonam ⁵⁹. Desde su aparición se han identificado 24 variantes.

Se considera que el principal reservorio de las enterobacterias productoras de NDM es el subcontinente indio (Pakistán, India y Sri Lanka) ⁶⁰. Se estima que la prevalencia de individuos portadores fecales de enterobacterias productoras de NDM en esta zona oscila entre el 5 y el 15% ^{61,62}. Sin embargo, también se consideran reservorios de enterobacterias productoras de NDM los países balcánicos ⁶³, la península arábiga ^{64,65} y los países del norte de África ⁶⁶. Por todo ello, se considera que los viajes intercontinentales juegan un papel importante en la diseminación de enterobacterias productoras de NDM, ya que la presencia de este tipo de enzimas se ha identificado en países donde suelen vivir oriundos de India y Pakistán como Canadá, los Estados Unidos, Reino Unido, Irlanda, el sur de África, Arabia Saudí y Australia. En España se han descrito de forma esporádica ⁶⁷.

2.3 Carbapenemasas de clase D

Entre las carbapenemasas de clase D encontramos las de tipo OXA. Este tipo de enzimas tuvieron un incremento importante a finales de los 70 y principios de los 80, convirtiéndose en una de las familias de betalactamasas más prevalentes. En la actualidad su diseminación está amplificada por las carbapenemasas de clase D presentes en *Acinetobacter* y en las enterobacterias, esta última marcada por la OXA-48 y sus variantes ⁶⁸. En general no se inhiben por el ácido clavulánico ni por EDTA y se conocen muchas variantes en las secuencias de aminoácidos ⁸. El avibactam es capaz de inhibir las enzimas de la familia OXA-48, pero no las de otros grupos de OXA. Al contrario que éste, el vaborbactam o el relebactam, no tienen efecto inhibitor sobre las enzimas de esta clase ¹⁰.

Las betalactamasas de clase D, también denominadas OXAs (“oxacilinasas”), incluyen más de 400 enzimas entre las que se encuentran algunas con actividad carbapenemasa ⁶⁹. Con excepción de algunas enzimas tipo OXA (por ejemplo, OXA-163), este grupo no hidroliza las cefalosporinas de amplio espectro (o producen una leve hidrólisis). Todas las enzimas de este grupo poseen una débil actividad carbapenemasa por lo que no siempre confiere gran resistencia a los carbapenems a menos que se acompañe de otros mecanismos de resistencia como puede ser una alteración en la permeabilidad de la membrana ^{68,70}.

Aunque la mayoría de estas enzimas se han identificado en *Acinetobacter* spp., OXA-48 y sus derivadas se han encontrado en *Enterobacterales* ⁷¹. La primera cepa de *K. pneumoniae* productora de OXA-48 se aisló en Turquía en 2001 ⁷². Desde entonces, se ha ido diseminando a otros países europeos procedente de aquellos considerados como reservorios como son Turquía y los países del norte de África ⁷¹. Ha causado brotes hospitalarios en países como Francia, Alemania, Suiza, España, Países Bajos y Reino Unido ^{73–79}. Uno de los factores que contribuyen a su exitosa diseminación entre las distintas especies de enterobacterias es la facilidad del plásmido que contiene el gen *bla*_{OXA-48} en transferirse ⁸⁰.

Además, se han publicado casos de aislados productores de OXA-48 en Oriente Medio, Líbano, Sultanato de Omán, Arabia Saudí y Kuwait ^{81–86}. En África se han identificado en los países del norte, aunque también se ha notificado en Senegal y Sudáfrica ^{87,88}.

Una variante de OXA-48 es la denominada OXA-181, la cual difiere de OXA-48 en una mutación puntual ⁸⁹. Comparten las mismas propiedades hidrolíticas pero el entorno genético es diferente. Este hecho indica que la diseminación de cada una no está relacionada. El gen *bla*_{OXA-181} se ha encontrado en países como Francia, Reino Unido, Noruega, Sultanato de Omán, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, Singapur y Sri Lanka ^{71,87,90}.

Recientemente, se ha identificado OXA-204 en una serie de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes procedentes de Argelia o Túnez. En comparación con OXA-48, tiene dos cambios aminoácidos y su perfil hidrolítico es muy similar ⁹¹. OXA-232 deriva de OXA-181 y posee 5 sustituciones de aminoácidos en comparación con OXA-48. Su actividad hidrolítica frente a los carbapenems es inferior a la de OXA-48. Recientemente se ha asociado a un aislado de *K. pneumoniae* productor de NDM-1 ⁹².

Por último, OXA-163 difiere de OXA-48 en una sustitución aminoacídica y en la delección de 4 aminoácidos. Aunque afecta a los carbapenems en menor medida que OXA-48, entre sus sustratos se encuentran las cefalosporinas de amplio espectro y su actividad se inhibe parcialmente en presencia de ácido clavulánico. OXA-163 se aisló por primera vez en Argentina ⁹³ en cepas de enterobacterias (*E. cloacae* y *K. pneumoniae*).

3. Epidemiología y diseminación de carbapenemasas

Los antibióticos betalactámicos se consideran el tratamiento de elección de las infecciones causadas por los microorganismos Gram negativos. Después de la introducción de las denominadas cefalosporinas de amplio espectro (cefalosporinas de tercera y cuarta generación) en el arsenal terapéutico comenzaron a aparecer diversos mecanismos de resistencia, principalmente las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Las bacterias productoras de BLEE se han diseminado a nivel mundial por dos vías, una por expansión clonal y otra a través de ETH ⁹⁴. Además, suponen un problema de salud pública debido a que suelen llevar asociadas resistencias a otras familias de antibióticos, entre ellos los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas ⁹⁵.

Los carbapenems se incluyen entre los antimicrobianos de elección en el tratamiento de las infecciones graves producidas por bacilos Gram negativos y en especial por las enterobacterias productoras de BLEE ^{96,97}. Se ha postulado que su amplio uso ha supuesto la selección de resistencias a este grupo de antibióticos y por consiguiente la aparición de bacterias multirresistentes, entre ellas las productoras de carbapenemasas.

El origen y distribución geográfica de las distintas carbapenemasas es muy diversa. Aunque todas aparecieron en los últimos años del siglo XX y primeros del siglo XXI, veinte años más tarde, estas enzimas se habían instaurado y expandido a nivel mundial. En las figuras 1 y 2 se observa la distribución global y en Europa, respectivamente, de EPCs. En la figura 1 se observa que hasta el año 2014 se habían producido casos esporádicos a nivel mundial de enterobacterias productoras de las distintas enzimas (NDM, VIM, OXA-48 KPC e IMP). Sin embargo, las zonas endémicas de estas enzimas, sobre todo de OXA-48, quedaban restringidas al norte de África y sur de Asia. La figura 2 muestra la distribución por toda Europa de casos esporádicos de las diferentes enzimas, en este caso, las zonas endémicas de estas enzimas quedaban restringidas al Reino Unido (NDM), Italia (KPC) y Grecia (VIM y KPC). En la actualidad, tanto OXA-48 como las variantes KPC se han expandido también en España ⁹⁸.

3.1 Epidemiología de las carbapenemasas de clase A

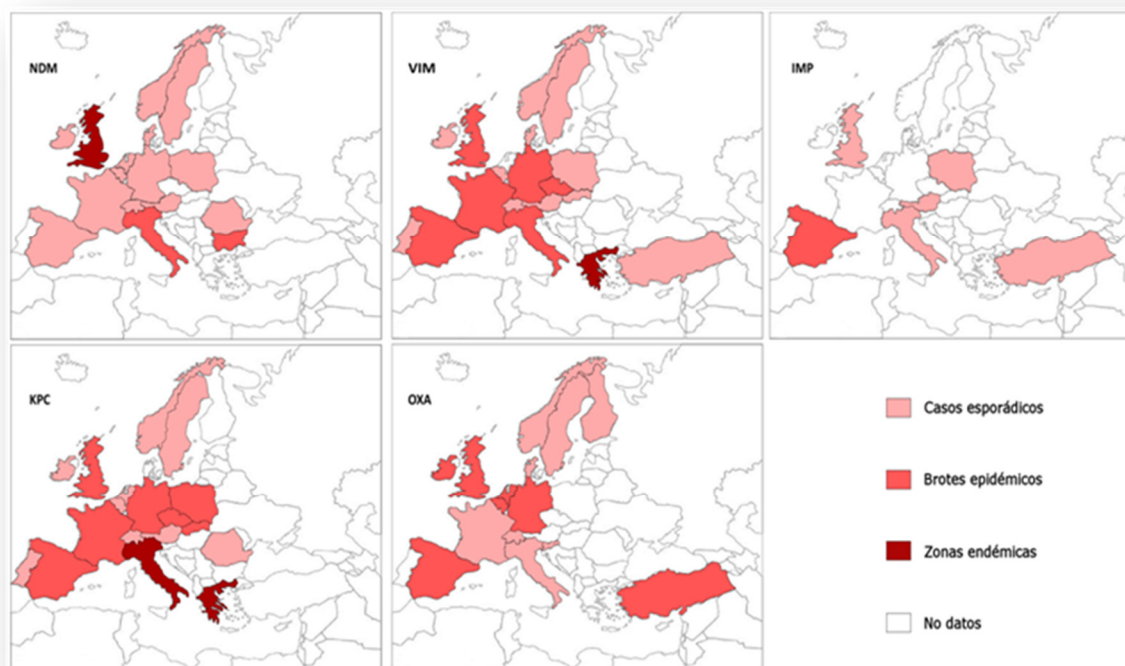
De todas las carbapenemasas de este grupo, solo dos, KPC y GES, se consideran de importancia epidemiológica. Estas enzimas se han descrito en varios plásmidos, clones y especies de entero-

bacterias. Los genes de localización cromosómica que codifican este tipo de enzimas se han encontrado en especies como *Enterobacter* spp. (*bla_{NMC-A}* y *bla_{IMI}*), *Serratia* spp. (*bla_{SME}* y *bla_{SFC}*) y *Pseudomonas* spp. (*bla_{BIC}*)^{99,100}.

Figura 1. Representación de la distribución global de carbapenemasas (adaptado de Oteo y cols. EIMC, 2014)



Figura 2. Representación de la distribución en Europa de carbapenemasas (adaptado de Oteo et al. EIMC, 2014)



De las variantes de KPC, las más frecuentes en *Enterobacterales*, sobre todo en *K. pneumoniae*, son KPC-2 y KPC-3. Las enzimas de tipo KPC se han encontrado en un gran número de secuencias tipo (ST), aunque la mayoría de aislados pertenecen a las ST14 y ST258^{100,101}. El primer aislado productor de KPC se encontró en 2001 en los Estados Unidos^{94,102}. Cinco años después, se publicaron en Nueva York distintos brotes nosocomiales debidos a *K. pneumoniae* productora de KPC. Al mismo tiempo, estos aislados productores de KPC se encontraron en Sudáfrica, Israel y China.

En Europa, la primera enzima tipo KPC se describió en 2008¹⁰³ en Grecia donde las EPCs son endémicas desde entonces^{30,104}. De hecho, según un estudio de vigilancia nacional realizado en 2011, el 89,5% de las 270 EPCs fueron productoras de KPC¹⁰⁵. En Italia se han descrito brotes en varios hospitales y la diseminación de este tipo de enzima ha sido relativamente rápida^{106,107}. En los países del norte y oeste de Europa la prevalencia de estos aislados se considera aún baja, esporádicamente se describen algunos brotes pero en su mayoría son casos importados de zonas endémicas^{101,108}. Los aislados de *K. pneumoniae* con mayor distribución global pertenecen a la ST258, esta secuencia tipo pertenece al complejo clonal 292 (CC292), el cual incluye 96 STs¹⁰⁹. Los primeros aislados productores de KPC en Noruega, Suecia y Reino Unido procedían de pacientes repatriados de Grecia e Israel y pertenecían a la ST258^{110,111}. El primer aislado productor de KPC en Hungría también procedía de un paciente repatriado de un hospital griego y pertenecía a la ST258¹¹². Sin embargo, en España, uno de los primeros brotes descritos por enterobacterias productoras de KPC no pertenecía a este clon epidémico y fueron descritos en el Hospital Universitario Ramón y Cajal¹¹³.

Las enzimas de tipo GES se identificaron por primera vez en aislados de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*^{25,37}. Son pocos los casos descritos por *Enterobacterales* productor de GES. En 2004 se describió un brote nosocomial debido a una cepa de *K. pneumoniae* productora de este tipo de enzima¹¹⁴.

3.2 Epidemiología de las metalo-betalactamasas

Las carbapenemasas de este grupo que se encuentran más diseminadas corresponden a los tipos IMP, VIM y NDM¹⁰⁰.

La mayoría de las enzimas de tipo IMP se han identificado en *P. aeruginosa*. Sin embargo, la primera IMP se aisló de una cepa de *S. marcescens* en Japón (1991)⁶⁹. También se han descrito en este país en otras especies de *Enterobacterales* como *C. freundii*, *M. morganii* y *E. cloacae*⁸. Además se encuentran de manera esporádica en Australia, Singapur y China^{101,115}. En Europa, las enterobacterias que producen las enzimas tipo IMP se han encontrado en Turquía (*K. pneumoniae* y *E. coli*)¹¹⁶, Reino Unido (*K. pneumoniae*) y Polonia (*K. pneumoniae*)⁹⁴. Entre los aislados de *K. pneumoniae*, la ST más frecuente se corresponde con la ST11, relacionada con IMP-1 e IMP-8^{40,117}. La ST11 es muy habitual en aislados de *K. pneumoniae*, sobre todo en aquellos que producen BLEE. También se ha detectado enzimas de este grupo en otras STs como es el caso de IMP-35 identificada en aislados de *K. pneumoniae* correspondientes a la ST622¹¹⁸.

Las enzimas de tipo VIM se han encontrado por toda la geografía mundial, a excepción del norte de Europa y los Estados Unidos donde los brotes por microorganismos que producen VIM aún tienen

baja incidencia ⁸. La cuenca mediterránea (principalmente Grecia), se considera una de las zonas con mayor prevalencia ^{94,101}. Las variantes más frecuentes son VIM-1 en *Enterobacterales* y VIM-2 en *P. aeruginosa*. Hasan y cols. ¹¹⁹ comprobaron que durante el brote epidémico en Grecia (2005-2006), un número limitado de clones fueron responsables de la diseminación de genes *bla*_{VIM}, siendo las ST14, ST36, ST147 y ST323 las más prevalentes. El mayor problema de salud pública asociado a MBLs fue el brote causado por enterobacterias productoras de NDM (principalmente *K. pneumoniae* y *E. coli*). Esta enzima se describió por primera vez en Nueva Delhi ¹⁰¹, donde actualmente tienen una situación endémica ^{8,101,120}. Más tarde, se identificó en Oriente Medio ¹⁰¹ y en Europa, a excepción de Gran Bretaña, donde tienen una situación endémica, se han descrito brotes esporádicos en Italia y los países Balcánicos ^{104,120,121}. En España su descripción es menos frecuente ^{29,122,123}. En el continente americano se han descrito muy pocos casos ¹²¹. A diferencia de las enzimas tipo KPC, no hay clones predominantes relacionados con la rápida diseminación de NDM. Existen diferentes estudios que demuestran una gran diversidad clonal en *E. coli* productor de NDM, aunque con relativa frecuencia estos clones se han asociado con las STs ST101 y ST131 ^{109,124,125}. En *K. pneumoniae* también se han identificado una gran variedad de clones asociados con la diseminación de las enzimas tipo NDM, siendo las STs identificadas con mayor frecuencia ST14, ST15, ST147 y ST340 ¹²⁶. Por otro lado, se han asociado otros genes de resistencia antibiótica junto con la producción de NDM, como pueden ser los genes que codifican OXA-48, VIM, BLEE, AmpC de codificación plasmídica, genes de resistencia a aminoglucósidos (por ejemplo, 16S ARNr metilasas, que confieren resistencia a todos los aminoglucósidos) y genes de resistencia a sulfametoxazol ⁶⁹.

3.3 Epidemiología de las carbapenemasas de tipo OXA-48

Las carbapenemasas de clase D presentes en *Enterobacterales* se reducen a las enzimas relacionadas con OXA-48. El gen *bla*_{OXA-48} no suele encontrarse en aislados de *P. aeruginosa* ni en *Acinetobacter*; principalmente se ha detectado en *K. pneumoniae*, aunque también se ha descrito su presencia en *E. coli* y *E. cloacae*. Como se ha indicado con anterioridad, el primer aislado de *K. pneumoniae* productor de OXA-48 se identificó en Turquía en 2001, donde esta enzima se ha instaurado y ha causado importantes brotes nosocomiales ⁷¹. Posteriormente, se diseminó por la cuenca mediterránea en el norte de África, incluyendo Líbano, Egipto, Túnez, Marruecos, aunque también se ha encontrado en Senegal ^{81,88,89,127}. La prevalencia de estas enzimas está aumentando de manera considerable en Europa (Francia, Alemania, España, Países Bajos y Reino Unido) ^{29,94}. Según el programa de vigilancia SENTRY, se ha producido un aumento del 3% en 2007 al 27% en 2009, siendo mucho mayor en los últimos años ¹²⁸. En América se han producido por el momento pocos casos debido a aislados productores de OXA-48 ¹²⁹. A diferencia de lo acontecido con las enzimas de KPC, la dispersión de estas enzimas no se ha ligado a unos pocos clones y se ha detectado en varios clones de *K. pneumoniae* diseminados mundialmente, siendo más frecuente ST101, seguida de ST14, ST15, ST147 y ST395 ¹³⁰.

4. Importancia de los plásmidos, integrones y de los clones de alto riesgo en la persistencia y diseminación de las enterobacterias productoras de carbapenemasas

La dispersión de las EPCs se ha producido en los últimos años no solo por un efecto de selección por el incremento de los antibióticos carbapenémicos sino también por la eficiente asociación de los genes responsables de su producción con los ETH, esencialmente plásmidos y transposones, y su presencia en los denominados clones de alto riesgo. Este proceso podría ser similar al que aconteció previamente con las BLEE de tipo CTX-M¹³¹. Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos de ADN circular presentes en las bacterias que se replican independientemente del ADN de la célula huésped. La transferencia horizontal de plásmidos portadores de genes de resistencia es uno de los principales mecanismos utilizados por las bacterias para la diseminación de la resistencia antibiótica⁶. Se considera que una bacteria exitosa es un vehículo eficaz para la diseminación de ETH tales como plásmidos y transposones o los integrones presentes en estos últimos¹⁰⁹.

Los plásmidos portadores de genes de resistencia se pueden dividir en dos grandes grupos: uno, con estrecho rango de huésped, los cuales pertenecen normalmente en las enterobacterias al grupo de incompatibilidad F (IncF), y el grupo con amplio rango de huésped, los cuales suelen pertenecer a IncA/C, IncL/M e IncN. Este grupo se puede transferir fácilmente entre distintas especies, mientras que el grupo con estrecho rango de huésped tiende a ser restrictivo y sólo se transfiere entre bacterias de la misma especie¹³². No obstante, los plásmidos epidémicos pertenecientes a IncF tienen la capacidad de adquirir genes de resistencia y diseminarse rápidamente entre las diferentes especies de la familia de las enterobacterias y habrían sido responsables entre otros de la dispersión importante y acelerada de las BLEE de tipo CTX-M^{133–135}. En el caso de las carbapenemasas tipo OXA-48, su diseminación se ha asociado con plásmidos tipo IncL, mientras que las KPC se han asociado con plásmidos de los grupos IncR e IncFII, las NDM en IncX3 e IncFII, y las VIM a una gran variedad de plásmidos, entre ellos A/C, IncR, IncHI2, IncI1 and IncW^{9,136}.

Los integrones son plataformas genéticas que permiten a las bacterias evolucionar rápidamente a través de la adquisición, almacenamiento, escisión y el reordenamiento de marcos de lectura abiertos encontrados en elementos móviles llamados casetes. La estructura de cualquier integrón incluye una plataforma estable y una matriz de casetes variables. La plataforma contiene: i) el gen que codifica la integrasa (*IntI*); ii) un sitio de recombinación para la integración de los casetes, sitio *attI* y iii) un promotor, PC, dentro del gen *intI* o entre *intI* y el *attI*, que está orientado hacia el punto de integración y conduce la expresión de los genes casetes. Los casetes son elementos circulares no replicativos que generalmente contienen un gen sin promotor y un segundo sitio de recombinación: el sitio *attC*. Estos genes funcionan a través de su integración en la plataforma y expresión del promotor de PC¹³⁷.

Los integrones están presentes en el cromosoma de aproximadamente el 17% de las especies bacterianas para las cuales tenemos disponible la secuenciación del genoma completo. Los integrones cromosómicos pueden ser muy grandes, ocupando un porcentaje elevado del genoma de una especie. Tal es el caso de los superintegrones encontrados en el género *Vibrio* que pueden incluir

más de 200 casetes. El superintegrón mejor estudiado es el de *Vibrio cholerae*¹³⁸ que alberga alrededor de 175 casetes, representando así el 3% de su genoma.

Actualmente se acepta que los integrones cromosómicos pueden asociarse con otros elementos móviles y plásmidos conjugativos para instaurarse en bacterias de relevancia clínica, son los denominados integrones móviles¹³⁹⁻¹⁴¹. Esto ha permitido la dispersión eficiente de los integrones tanto en miembros de la misma especie como de diferentes especies. Los integrones móviles se clasifican en 5 tipos en función de la secuencia de la integrasa y están relacionados, casi exclusivamente, con genes de resistencia a antibióticos. Las clases 1 y 3 están asociadas al transposon *Tn402*, mientras que la clase 2 se asocia a *Tn7*, estas tres clases son las de mayor relevancia clínica ya que históricamente, son las que se han asociado a la diseminación de la multirresistencia. Los integrones de clase 1 se han asociado con más de 130 casetes que codifican mecanismos de resistencia para casi todas las familias de antimicrobianos, incluyendo betalactámicos, aminoglucósidos, trimetoprim, cloranfenicol, estreptomicina, fosfomicina, macrólidos, rifampicina y antisépticos de la familia de los compuestos de amonio cuaternario^{142,143}. Entre los betalactámicos, destacan los genes de carbapenemasas, entre ellos genes de las metalo-betalactamasas VIM e IMP³⁵. Por otro lado, los integrones cromosómicos, normalmente llevan casetes de funciones desconocidas. Análisis combinados de metagenómica y casetes cromosómicos de especies de *Vibrio* revelan que hasta el 65% de las proteínas codificadas en estos casetes no tienen homólogos y el 13% de las proteínas tenían homólogos de función desconocida¹⁴⁰.

Finalmente, junto con los plásmidos e integrones, los clones de alto riesgo están estrechamente relacionados con la diseminación de EPCs. De esta forma, las pandemias causadas por *E. coli* y *K. pneumoniae* multirresistentes se deben mayoritariamente a la diseminación global de ciertos clones de alto riesgo como son *E. coli*-ST131 y *K. pneumoniae*-ST258¹³⁶. Estos clones han adquirido ciertos rasgos adaptativos que aumentan su capacidad de persistencia y supervivencia, lo que se suele acompañar de la adquisición de determinantes de resistencia a los antibióticos y virulencia. Ejemplos de algunos clones de alto riesgo entre las enterobacterias son *E. coli* ST38, ST69, ST131, ST155, ST393, ST405 y ST648 y *K. pneumoniae* ST14, ST37, ST147, ST258 y más recientemente ST307^{6,144}.

Para calificar a un clon como internacional de alto riesgo debe cumplir las siguientes características¹⁴⁵: (I) distribución global, (II) asociación con varios determinantes de resistencia antimicrobiana, (III) capacidad para colonizar y persistir en el hospedador durante largos períodos de tiempo (> 6 meses), (IV) capacidad de transmisión eficiente entre hospedadores, (V) mayor patogenicidad y *fitness*, y (VI) capacidad para causar infecciones graves y/o recurrentes.

Los clones de alto riesgo probablemente poseen algunos tipos de factores biológicos que conducen a una mayor "aptitud" (*fitness*), lo que proporciona a estas cepas ventajas adaptativas sobre otros aislados de la misma especie. Posiblemente, tales ventajas les confieren la capacidad de superar a otros linajes bacterianos y convertirse en la principal población bacteriana en esa área. Esto a su vez, proporcionará a estos clones mayores oportunidades para propagarse, así como tiempo para persistir y adquirir nuevos determinantes de resistencia a los antimicrobianos de otras bacte-

rias ¹⁴⁶. Finalmente, la presión selectiva ejercida por el consumo antibióticos tanto en las instituciones sanitarias como en la comunidad, puede facilitar la selección y diseminación de estos clones multirresistentes ⁶.

Se ha descrito una estrecha relación entre estos clones y los plásmidos IncF epidémicos que contienen los tipos de replicón FIA y FII, así como con otras plataformas genéticas (genes, integrones y transposones), que han contribuido a la diseminación global de la resistencia antibiótica. Estos clones de alto riesgo han jugado un importante papel en la emergencia y diseminación de los genes que codifican BLEE y carbapenemasas en enterobacterias ^{132,136}. Así por ejemplo, en un estudio realizado recientemente en España, Estaban-Cantos y cols. ¹⁴⁷, demostraron que la estructura poblacional de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa era más clonal que la compuesta por aislados sin mecanismos de resistencia adquiridos y aislados productores de BLEE. En este estudio se puso de manifiesto la importancia de los clones de alto riesgo ST11 y ST15 entre las cepas productoras de carbapenemasas en nuestro país. Otro estudio, también realizado en España, demostró que la mayoría de aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC se agruparon en 5 clones, ST11 y ST512, relacionados con diseminación interregional; ST101, asociado con diseminación regional, y ST1961 y ST678, relacionados con brotes esporádicos. Además, este estudio demostró que el clon ST101 tenía mayor número de genes de resistencia y virulencia ¹⁴⁸.

Por otro lado, los clones de alto riesgo también los podemos encontrar implicados en la diseminación de mecanismos de resistencias en otros tipos de bacterias como son los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNF). Recientemente, se ha llevado a cabo en nuestro país un estudio cuyo objetivo fue analizar el perfil de sensibilidad (incluyendo las nuevas combinaciones), la epidemiología molecular y los mecanismos de resistencia implicados en las infecciones producidas por *P. aeruginosa*. Se trata de un estudio de vigilancia epidemiológica a gran escala en el que se observa una alta prevalencia de aislados extremadamente resistentes (XDR) y resistentes a la mayoría de los agentes antipseudomónicos con excepción de colistina y las nuevas combinaciones como son ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam. Un hallazgo importante de este estudio es la diferencia tanto interhospitalaria como interregional de la prevalencia de los clones de alto riesgo asociados con cepas XDR y de la resistencia a las nuevas combinaciones. No obstante, a pesar de la variabilidad entre regiones, se demostró la presencia de un clon (ST175) ampliamente disperso y asociado más frecuentemente con la producción de carbapenemasas en España ¹⁴⁹. Una situación similar podría acontecer con las enterobacterias productoras de carbapenemasas de tipo VIM.

Otra de las características de los clones de alto riesgo es una mayor capacidad patógena o virulencia, aunque esta es una característica no siempre demostrada ⁶. Así por ejemplo, el clon de ST258 de *K. pneumoniae* asociado con la expansión de KPC, carece de los determinantes genéticos tradicionalmente asociados con la virulencia en *K. pneumoniae* como son los antígenos capsulares K1, K2, y K5, los genes de la aerobactina o el gen *rmpA2* que codifica el fenotipo hipermucoso. De igual forma, en modelos animales tampoco se ha demostrado una mayor letalidad asociada a estas cepas ⁶. Por el contrario, recientemente se ha descrito en China un brote por neumonía asociada a ventilación mecánica causado por una cepa hipervirulenta de *K. pneumoniae*-ST11. Esta cepa, además de ser multirresistente portaba un plásmido con factores de virulencia (*iuc*, sideróforo-aerobactina y *rmpA2*, hipermucoide), normalmente asociado al clon ST23 ¹⁵⁰. De igual forma, en Argentina

se ha descrito la emergencia de cepas hipermucosas de *K. pneumoniae*-ST17 y ST25 productoras de KPC-2 ¹⁵¹. Dado que la virulencia y los mecanismos de resistencia pueden estar asociados a plásmidos, no es de extrañar que ambos factores converjan en clones de alto riesgo. En este sentido, tradicionalmente la mayoría de estudios se han centrado por separado en virulencia y mecanismos de resistencia. No obstante, en los últimos años la relación entre virulencia y resistencia se estudian cada vez más. En algunos estudios se ha sugerido que los plásmidos portadores de carbapenemasas no solo juegan un papel importante en la resistencia a carbapenems, sino que también están implicados en la virulencia de las bacterias ^{152,153}. La convergencia de hipervirulencia y resistencia a carbapenems en aislados de *K. pneumoniae* puede convertirse en un futuro en un serio problema de Salud Pública.

5. Asociación de las carbapenemasas con otros mecanismos de resistencia

La presencia de carbapenemasas suele ir acompañada por otros mecanismos que confieren resistencia a otras familias de antimicrobianos ¹⁰¹. Estos mecanismos son de codificación plasmídica o cromosómica por lo que se pueden producir variaciones en el perfil de sensibilidad entre cepas, instituciones y áreas geográficas.

Colistina, tigeciclina y fosfomicina suelen ser antibióticos con buena actividad *in vitro* en cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC o VIM ^{154–156}. Las enterobacterias que producen este tipo de enzimas suelen ser sensibles a amikacina, pero no al resto de los aminoglucósidos de uso clínico. Por otra parte, las enterobacterias productoras de NDM suelen ser resistentes a todos los aminoglucósidos debido a la presencia de 16S ARNr metilasas, enzimas que modifican la estructura del ribosoma y confieren resistencia a todos los antibióticos de este grupo ¹⁵⁷. Por último, las fluoroquinolonas y trimetoprim-sulfametoxazol se utilizan en contadas ocasiones para el tratamiento de este tipo de infecciones ya que con frecuencia los aislados productores de carbapenemasas son resistentes a estos antibióticos.

En cuanto a los betalactámicos, el perfil de sensibilidad *in vitro* puede ser variable y en ocasiones los carbapenems e incluso las cefalosporinas de amplio espectro pueden mantener su actividad, mostrándose sensibles (S o I) en el antibiograma. Este hecho es debido a que los carbapenems pueden mantener su actividad bactericida, o como en el caso de las cefalosporinas o el aztreonam no se ven afectados por la carbapenemasa. En general, los aislados productores de MBL y OXA pueden presentar valores de CMI para los carbapenems más bajos que las cepas productoras de KPC. Asimismo, las cefalosporinas de amplio espectro suelen ser estables o se afectan poco por las enzimas del grupo OXA-48, mientras que aztreonam no suele verse afectado por enzimas del tipo MBL como NDM y VIM. A pesar de esto, los aislados productores de MBL y OXA normalmente son resistentes a estos antibióticos betalactámicos debido a la presencia de otro tipo de betalactamasas, en general las BLEE o AmpC plasmídicas ¹⁵⁸.

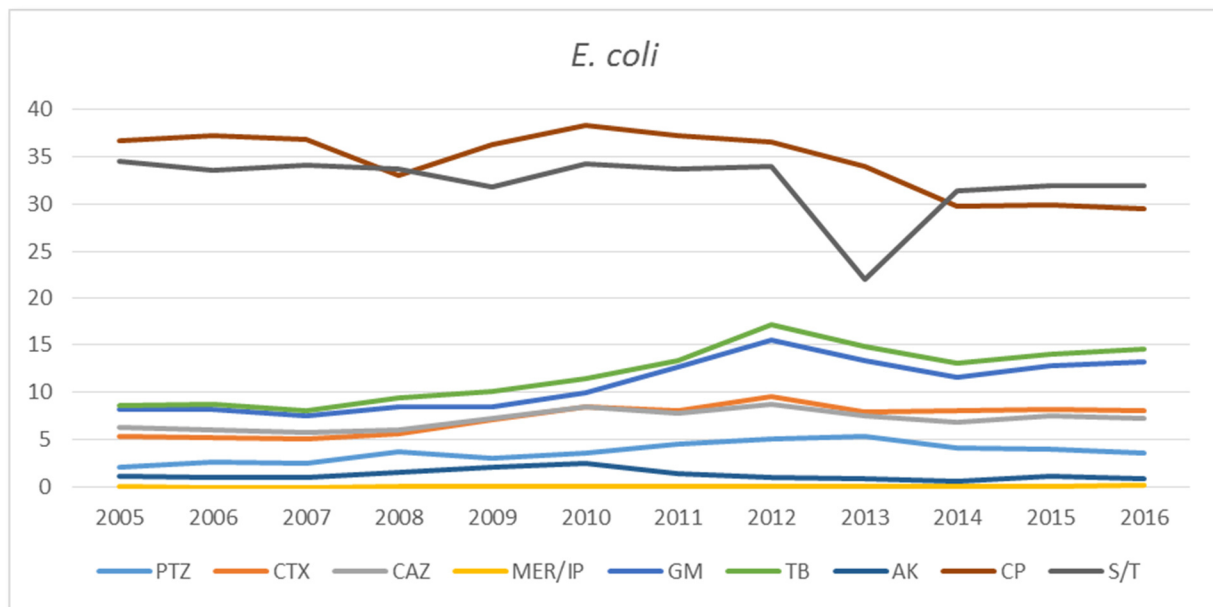
El programa MYSTIC (“*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*”) es un estudio longitudinal de vigilancia de la resistencia antibiótica. Se inició en 1997 en los Estados Unidos con el objetivo de monitorizar los cambios in vitro de la actividad de meropenem y otros grupos de antibióticos frente a enterobacterias, bacilos Gram negativos no fermentadores y cocos Gram positivos. Un dato interesante de este estudio fue la descripción del incremento de aislados de *Klebsiella* sp. productores de KPC. En el año 2005 se observó un aumento rápido en la resistencia a las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos en comparación con las tasas estables observadas desde 1999 hasta 2004. Esto se debió a las co-resistencias encontradas en los plásmidos portadores de *bla*_{KPC}. En este estudio (1999-2008) se observó que los carbapenems seguían teniendo gran actividad frente a las enterobacterias excepto en aquellos aislados productores de KPC los cuales formaban parte de una epidemia en expansión ¹⁵⁹.

Esta evolución en las resistencias a los antimicrobianos la hemos observado en nuestra institución a lo largo de los años en los aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* (2005-2016). De esta forma, se ha observado un aumento progresivo de la resistencia a los carbapenems en *K. pneumoniae* (de 0,4% en 2005 al 9,5% en 2016) (figuras 3 y 4) (datos no publicados del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal). Paralelamente al incremento de la resistencia a los carbapenems, han aumentado las resistencias a las cefalosporinas de amplio espectro (de 2,9% en 2005 al 13,7% en 2016 para cefotaxima y de 3,2% en 2005 al 13,6% en 2016 para ceftazidima) y a la combinación de penicilina con inhibidores de la betalactamasas (de 4,2% en 2005 al 11,4% en 2016 para piperacilina-tazobactam), así como para otras familias de antimicrobianos. Es destacable el aumento de la resistencia a ciprofloxacino desde un 5% en 2005 a casi el 20% en 2016. Por el contrario, la amikacina ha sido el único antibiótico que ha conservado su actividad a lo largo de los años (figura 4).

A diferencia de *K. pneumoniae*, los carbapenems han presentado excelente actividad in vitro en *E. coli*. En el resto de los grupos de antimicrobianos se observa un ligero incremento de los porcentajes de resistencia, con la excepción de ciprofloxacino (36,7% en 2005 y 29,4% en 2016) y trimetoprim-sulfametoxazol (34,4% en 2005 y 31,9% en 2016) en los que el porcentaje de resistencia ha disminuido ligeramente (figura 3).

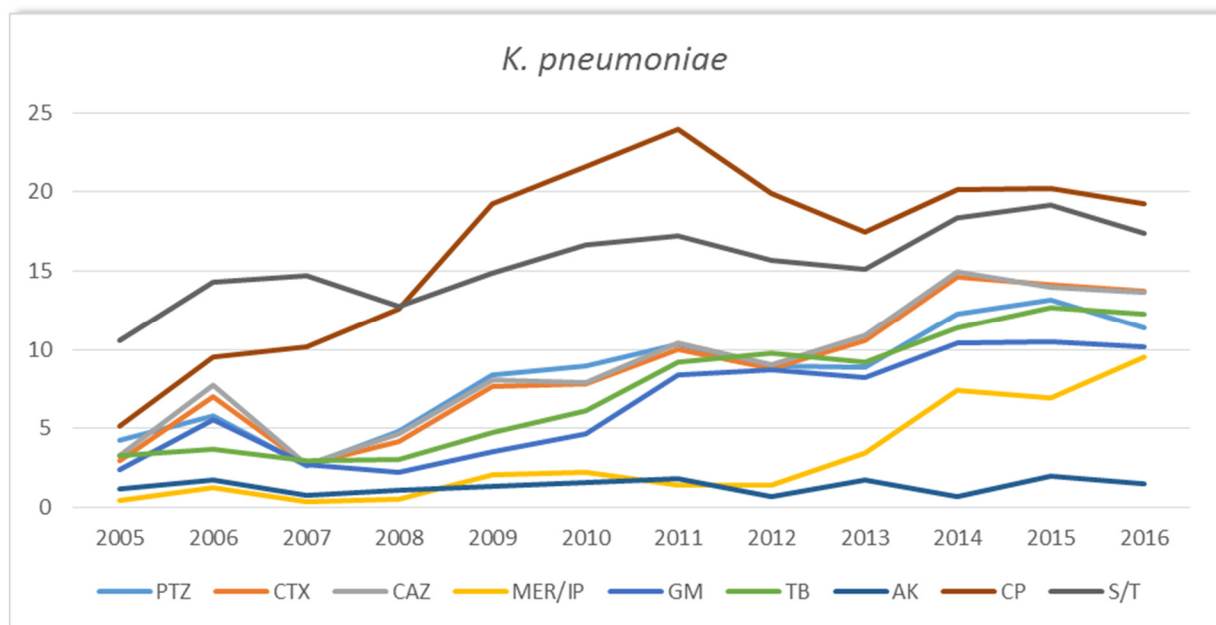
Por otro lado, además de conocer la evolución de las resistencias a los antimicrobianos a lo largo de los años, es interesante conocer la variabilidad geográfica y epidemiología en los distintos continentes. En este sentido el programa de vigilancia epidemiológica SENTRY, implementado en 1997, fue desarrollado para monitorizar los principales microorganismos aislados de distintas localizaciones y los principales perfiles de resistencia. Durante los primeros 20 años del programa (1997-2016), los principales microorganismos aislados fueron *Staphylococcus aureus* y *E. coli* (más del 40% de las bacteriemias), seguidos por *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*. Durante este período la prevalencia de *Enterobacterales* multirresistentes se incrementó de un 6,2% (período 1997-2000) a un 15,8% (período 2013-2016) (figura 5), como consecuencia del aumento de los aislados productores de BLEE y resistentes a los carbapenems, presumiblemente a expensas del aumento de los aislados productores de carbapenemasas (figura 6) ¹⁶⁰.

Figura 3. Porcentaje de resistencia a antimicrobianos de aislados de *E. coli* del Hospital Universitario Ramón y Cajal (2008-2016).



Abreviaturas: PTZ, piperacilina-tazobactam; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; MER/IP, meropenem/imipenem; Gm, gentamicina; Tb, tobramicina; Ak, amikacina; Cp, ciprofloxacino; S/T, trimetoprim-sulfametoxazol.

Figura 4. Porcentaje de resistencia a antimicrobianos de aislados de *K. pneumoniae* del Hospital Universitario Ramón y Cajal (2008-2016).



Abreviaturas: PTZ, piperacilina-tazobactam; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; MER/IP, meropenem/imipenem; Gm, gentamicina; Tb, tobramicina; Ak, amikacina; Cp, ciprofloxacino; S/T, trimetoprim-sulfametoxazol.

Figura 5. Porcentaje de *Enterobacterales* multirresistentes en el programa SENTRY (adaptado de Diekema y cols. AAC, 2019)

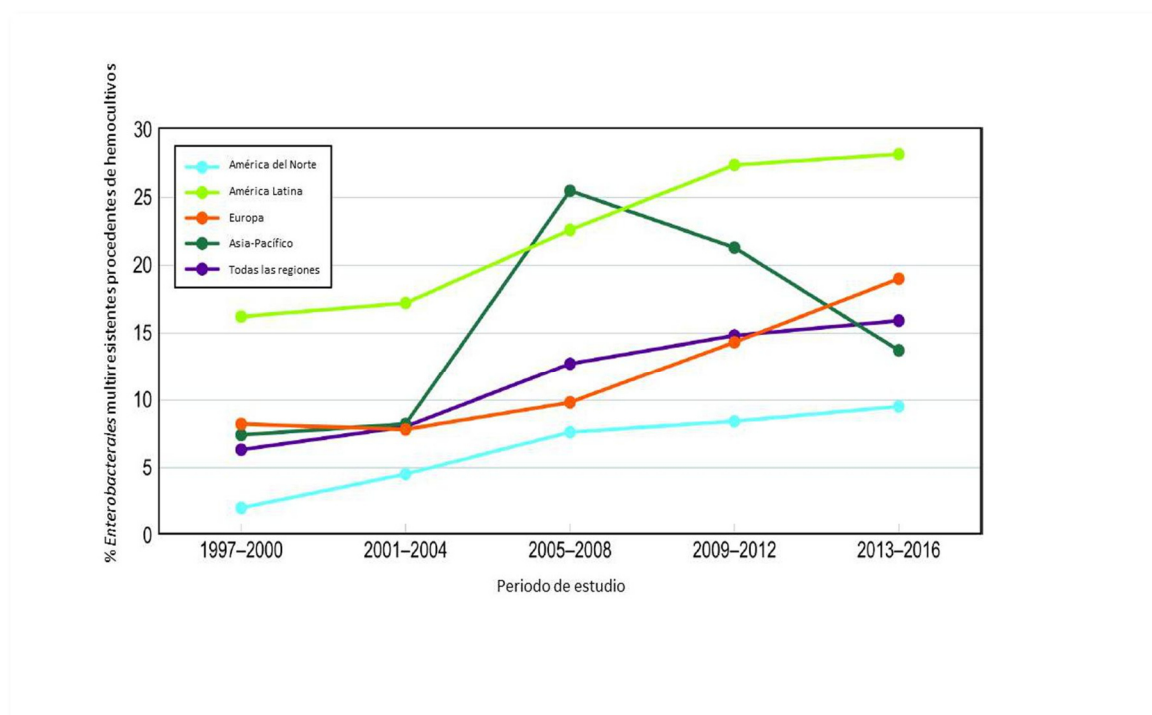
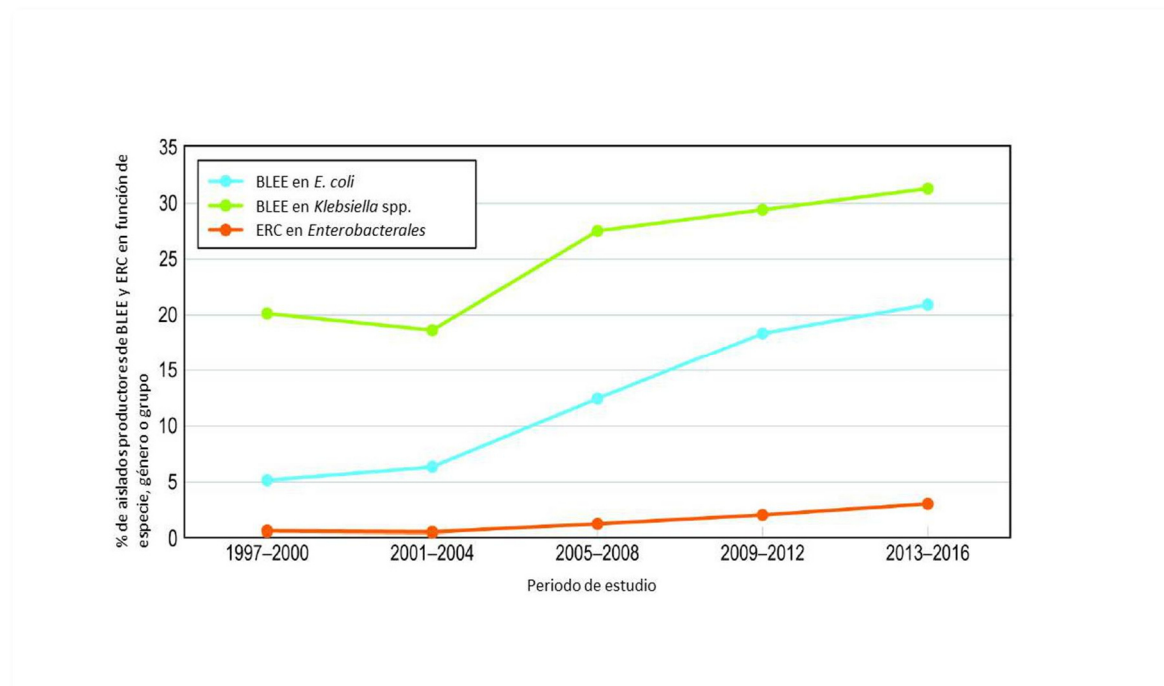


Figura 6. Porcentaje de *Enterobacterales* productores de BLEE y resistentes a carbapenems recogidos durante el programa SENTRY (adaptado de Diekema y cols. AAC, 2019)



6. Carbapenemasas en España

Los primeros casos de EPCs descritos en España se identificaron en un estudio diseñado para investigar la prevalencia de BLEE llevado a cabo en Barcelona en 2003. Se estudiaron 4.395 aislados clínicos y 2.398 aislados procedentes de muestras de vigilancia epidemiológica y se encontró un aislado de *E. coli* procedente de una muestra urinaria y un aislado de *K. pneumoniae* en una muestra de vigilancia epidemiológica que producían VIM-1 ¹⁶¹.

A partir de entonces, se describieron casos esporádicos y brotes por microorganismos productores de MBLs, principalmente del tipo VIM (tabla 2). En 2007, se describió en Madrid el primer brote por enterobacterias productoras de VIM-1 (acaecido en 2005) en el Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid. Los pacientes infectados y/o colonizados por VIM-1 se encontraban ingresados en distintas áreas hospitalarias (13 pacientes, 52%, en unidades de cuidados intensivos (UCIs); 7 pacientes, 28%, en áreas médicas; 4 pacientes, 16%, en áreas quirúrgicas y un paciente extrahospitalario que había estado ingresado dos meses antes en cirugía general) ¹⁶². En este brote, estaban implicadas diferentes especies de *Enterobacterales*, tales como *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli* y *K. oxytoca*. La tipificación molecular de estos aislados mostró una estructura poblacional compleja que incluía una diseminación tanto clonal como policlonal. En 2009, se detectó en otro hospital también de Madrid (Hospital Universitario Puerta de Hierro) una diseminación clonal de aislados de *K. pneumoniae* productores de VIM-1 pertenecientes a la ST15 ¹⁶³. Cincuenta y cinco pacientes ingresados en las UCIs médicas y quirúrgicas estaban infectados y/o colonizados por esta cepa, que también producía una nueva BLEE, SHV-134. Por otro lado, en otro hospital localizado en Madrid se identificaron 12 casos de pacientes pediátricos infectados por distintas especies productoras de VIM-1 (9 casos de *K. pneumoniae*, 2 de *E. coli* y un caso de *K. oxytoca*) ¹⁶⁴ y en Vizcaya se encontraron 3 casos de niños infectados por *E. cloacae* productor de VIM-1 ¹⁶⁵.

La frecuencia de enterobacterias productoras de VIM ha ido aumentando progresivamente y constituyen una de las carbapenemasas más frecuentes en España. Otros tipos de carbapenemasas tipo MBL, como IMP y NDM, son menos frecuentes, pero se han descrito casos esporádicos y pequeños brotes ^{29,122,123,166,167}.

En 2009 se llevó a cabo un estudio nacional multicéntrico ¹⁶⁸ donde, a pesar del amplio esfuerzo de cobertura geográfica, solo se detectaron 10 *Enterobacterales* productoras de IMP, 9 aislados clonales de *K. pneumoniae* que producían IMP-22 (todos procedentes de un mismo centro sanitario en Cádiz) y 1 *K. oxytoca* que producía IMP-28. También se han descrito otros tipos de IMP, en Sevilla se identificó un brote nosocomial por *K. oxytoca* con IMP-8 ¹⁶⁹.

A pesar de la diseminación a nivel mundial de las enzimas tipo NDM, en España se han producido pocos casos ¹⁷⁰. Todos fueron casos importados: un aislado de *E. coli* de un paciente con diarrea que había viajado a India ¹⁶⁷, un absceso abdominal por *K. pneumoniae* en un paciente que había estado hospitalizado en India ¹⁷¹ y una infección urinaria por *K. pneumoniae* en un paciente de 3 meses que había sido adoptado en India ¹⁷². Posteriormente se han descrito otros casos entre los que encontramos un brote en Madrid donde 7 pacientes de 3 hospitales diferentes (Hospital Universitario La Paz, Hospital de Cantoblanco y Hospital Central de la Cruz Roja) estaban colonizados o infectados por aislados de *K. pneumoniae* productores de NDM-7. Aparentemente no existió ninguna relación

de los pacientes con viajes internacionales, ni contacto con algún paciente procedente de una zona endémica, por lo que se desconoce cómo llegó este tipo de enzima a la zona ¹²³. Más recientemente, durante el estudio “Resistance of Gram-Negative Organisms: Studying Intervention Strategies (R-GNOSIS)”, se detectó un 5% (10/198) de aislados productores de NDM-1, donde el caso índice fue un paciente pakistaní ingresado en su país de origen y trasladado posteriormente a Madrid ^{173,174}.

Las primeras carbapenemasas de tipo KPC se detectaron en España por primera vez en el Hospital Universitario Ramón y Cajal, entre septiembre de 2009 y febrero de 2010. Fueron aislados de *K. pneumoniae* con el gen *bla*_{KPC-3} pertenecientes a las ST384 y ST388 ¹¹³. Al mismo tiempo, se identificaron en un hospital cercano 3 aislados clonales de *C. freundii* que contenían el gen *bla*_{KPC-2}; estas cepas se aislaron de pacientes sin una aparente relación epidemiológica ¹⁷⁵. En España, la mayoría de los aislados de *K. pneumoniae* con el gen *bla*_{KPC} no pertenecen al clon epidémico considerado de alto riesgo, ST258. Sin embargo, se ha identificado una cepa productora de KPC-2 aislada de un paciente que había estado ingresado en Grecia ¹⁷⁶. En nuestro país, la prevalencia de KPC en enterobacterias se considera baja, por lo que epidemiológicamente se puede considerar que se producen brotes hospitalarios esporádicos ^{29,104,122}, aunque en zonas como Andalucía, han ido aumentando los casos desde que se detectó la primera KPC, parece que el número de aislados productores de KPC en esta zona está disminuyendo en la actualidad (www.pirasoa.iavante.es). En 2012 se describió por primera vez en España un brote por un aislado de *K. pneumoniae*-ST512 con el gen *bla*_{KPC-3}. Este clon fue importado de un paciente procedente de Italia y desde su introducción en nuestro país se ha convertido en un clon exitoso desde el punto de vista epidemiológico. En un estudio multicéntrico llevado a cabo entre enero de 2012 y diciembre de 2014 se concluyó que los aislados productores de KPC están aumentando y se están diseminando por la geografía española principalmente debido a los clones de *K. pneumoniae* ST11/KPC-2, ST101/KPC-2 y ST512/KPC-3. El clon ST101/KPC-2 fue el que presentó mayor resistencia e hipervirulencia ^{148,177}. Asimismo, se ha destacado la importancia del clon ST307 productor de KPC-3, habiéndose descrito en él variantes de esta carbapenemasa en las que el avibactam no ejerce su acción inhibitoria confiriendo resistencia a ceftazidima-avibactam ¹⁷⁸.

Actualmente el mayor problema de salud pública en España debido a carbapenemasas se debe a la aparición y rápida diseminación de las enzimas de tipo OXA-48. El primer caso se describió en Barcelona en un aislado de *K. pneumoniae* perteneciente a la ST101, además esta cepa producía CTX-M-15 y era deficiente en porinas; se consideró el caso índice un paciente que había sido trasladado de Marruecos a Barcelona ⁷⁰. Posteriormente se han ido produciendo distintos brotes debidos a *K. pneumoniae* agrupadas en ST11, ST15, ST16 y ST405 ¹³⁰, generalmente asociados a una elevada mortalidad. Cabe destacar la aparición en 2012 de OXA-244 y OXA-245, derivadas de OXA-48. Ambas se describieron en un estudio realizado por el Laboratorio de Antibióticos del Centro Nacional de Microbiología. OXA-244 se aisló de un líquido ascítico de un varón de 51 años y perteneció a la ST392, mientras que OXA-255 se aisló en un brote en un hospital de tercer nivel en Málaga y perteneció a la ST437 ¹⁷⁹. Posteriormente se llevó a cabo un estudio en la Comunidad Autónoma de Andalucía con el objetivo de caracterizar aislados de *K. pneumoniae* productores de OXA-48. La conclusión del estudio fue que la diseminación de OXA-48 en esta zona es debida principalmente a la dispersión interhospitalaria de los clones ST15 y ST11 ¹⁸⁰. Recientemente, en un estudio diseñado para detectar la prevalencia de portadores fecales de BLEE al ingreso hospitalario, se detectó la

producción simultánea de BLEE y carbapenemasas, principalmente OXA-48. Este hecho es especialmente importante en aislados de *K. pneumoniae* donde se detecta un 43,1% de aislados productores de BLEE y carbapenemasa (90,57% de tipo OXA-48) ¹⁸¹.

En resumen, la prevalencia de EPCs y su complejidad ha aumentado rápidamente en nuestro país. En el estudio multicéntrico llevado a cabo en 2009, se observó una prevalencia de EPC del 0,04% (43 casos), detectándose exclusivamente enzimas del tipo VIM-1 e IMP-22 ¹⁸². Posteriormente, en un estudio multicéntrico realizado en 2013 se describió una prevalencia de EPC del 1,7% con mayor diversidad de carbapenemasas. Actualmente en España las enzimas más diseminadas son OXA-48 (62%) y VIM (11,3%), asociándose en su mayoría a aislados de *K. pneumoniae* ¹⁸³.

Tabla 2. Epidemiología de las carbapenemasas en España

Año	Descripción	Localización	Referencia
2003	Primeros aislados productores de VIM-1	Barcelona	161
2005	Primer brote de enterobacterias productoras de VIM-1	Madrid	162
2009	Diseminación clonal de <i>K. pneumoniae</i> -VIM-1	Madrid	163
2009	<i>K. oxytoca</i> productora de IMP-28	Madrid	166
2009	Primeros aislados productores de KPC	Madrid	113 175
2009	Primer aislado productor de OXA-48	Barcelona	70
2009	Resultados de un estudio multicéntrico demuestran una baja prevalencia (VIM)	-	168
2011	Primer aislado productor de NDM-1	Barcelona	167
2013	Resultados de un estudio multicéntrico demuestran un aumento de la prevalencia (OXA-48 y VIM-1)	-	183

7. Calorimetría aplicada a la determinación de la sensibilidad antibiótica

La detección de mecanismos de resistencia es clave en los laboratorios de microbiología y tiene gran repercusión tanto a nivel clínico como epidemiológico, sobre todo en los microorganismos multirresistentes como son las EPCs en los que es necesario adaptar terapias adecuadas que incluyen carbapenems (esencialmente meropenem asociado a otros antimicrobianos) o betalactámicos asociados a inhibidores de betalactamasas como ceftazidima-avibactam y próximamente meropenem-vaborbactam e imipenem-relebactam. La importancia clínica de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos está aumentando en paralelo a la preocupación por el aumento de las resistencias y el mal uso de los antibióticos. La falta de una solución rápida, de bajo coste y fácilmente disponible contribuye a un aumento de la prescripción y un uso excesivo de antibióticos. En el caso de los microorganismos productores de carbapenemasas se han propuesto diferentes técnicas que remedian la ausencia de pruebas fenotípicas de estudio de sensibilidad rápidas, entre las que destacan

las moleculares, las colorimétricas o las basadas en inmunocromatografías^{184,185}. Sin embargo, por la particularidad de este mecanismo de resistencia y su influencia en la elección del tratamiento antimicrobiano se necesitan pruebas fenotípicas que sean precisas y rápidas para poder establecer un tratamiento dirigido correcto en monoterapia o en la mayoría de los casos iniciar terapia combinada, situación habitual en los pacientes críticos.

Se han propuesto diferentes métodos fenotípicos en el estudio de sensibilidad de los microorganismos multirresistentes, incluyendo lecturas precoces de los valores de CMI o halos de inhibición de difusión con disco o técnicas más innovadoras como la citometría de flujo¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Algunos de estos métodos tienen como objetivo el discernir si el microorganismo estudiado produce o no carbapenemasas más que ofrecer un valor de CMI. Uno de los métodos innovadores en el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos es la calorimetría isotérmica¹⁸⁹, por el momento no aplicada al estudio de sensibilidad de las EPCs.

La calorimetría isotérmica mide el flujo de calor de cualquier proceso biológico y esto es proporcional a la velocidad a la que tiene lugar un proceso dado, ya sea físico o químico. El primer calorímetro isotérmico lo desarrollaron Lavosier y Laplace en 1782 para determinar el calor producido durante ciertos cambios químicos. Utilizaron hielo para mantener constante la temperatura de la reacción y se dieron cuenta que la masa del agua procedente del hielo era directamente proporcional al calor producido en la reacción que tenía lugar encima del hielo. Desde entonces se empezaron a hacer mejoras en el campo de la calorimetría y además surgieron otros tipos de calorímetros: adiabático, de presión constante, de volumen constante, diferenciales, etc¹⁹⁰.

Todas las células vivas producen calor en cada proceso fisiológico. A través de la monitorización del flujo de calor en función del tiempo podemos obtener cierta información sobre los sistemas biológicos. Los ensayos basados en la calorimetría son verdaderas medidas de la respuesta “fenotípica” celular. Los cambios en los estímulos externos, el estado de nutrientes o en el ambiente se reflejan en el estado metabólico de la célula, el cual es monitorizado directamente por el calorímetro. La calorimetría isotérmica es una medida continua y la curva que nos proporciona es comparable a una huella dactilar de cada proceso celular implicado. Por ejemplo, las curvas son diferentes para los procesos de necrosis y apoptosis, y los efectos de distintos compuestos se pueden clasificar en función de su perfil “cinético”. En procariotas hay distintos patrones de crecimiento para diferentes especies y diferentes patrones de crecimiento para distintos estados nutricionales. Esto se puede usar para una identificación y cuantificación rápida¹⁹¹.

Entre las ventajas de la calorimetría isotérmica aplicada al campo de la microbiología caben destacar las siguientes: i) sensibilidad, del orden de 0,2 μ W. La microcalorimetría isotérmica (MCI) puede detectar el calor producido por un inóculo bacteriano bajo. Los aparatos modernos de microcalorimetría son capaces de medir en el rango de microwatts, lo que permite en el terreno de la microbiología usar poco inóculo bacteriano (10^5 - 10^6 células bacterianas activas) para producir una señal en tiempo real relacionada con la cantidad de bacterias presentes y su actividad. Este inóculo bacteriano es el utilizado habitualmente en los estudios de sensibilidad. Asumiendo que una célula bacteriana típica produce alrededor de 2 pW, solo serían necesarias 100.000 bacterias para producir una señal detectable en la mayoría de los microcalorímetros isotérmicos comerciales. ii) exactitud,

los termostatos de los microcalorímetros se pueden configurar a cualquier temperatura dentro del rango de rendimiento de dicho instrumento con gran exactitud, normalmente en 0,02 °C. El rango del flujo de calor relacionado con la reacción que se puede medir es muy alto. Dependiendo del instrumento, es al menos ± 50 mW y como mucho ± 2000 mW. Esto es mejor que el rango de 0,2-500 μ W que normalmente produce un crecimiento detectable de microorganismos en 1-3 ml de medio de cultivo iii) obtención de datos en tiempo real de manera continua, la IMC nos proporciona una señal continua en tiempo real proporcional a la cantidad de calor producida en una ampolla con microorganismos iv) simplicidad y pasividad, en la forma más simple de IMC, la muestra con microorganismos se introduce en una ampolla que se sella y se sitúa en uno de los canales de medición. Las medidas del flujo de calor se realizan mientras haya señal (de horas a días). Además, debido a que las mediciones del flujo de calor son pasivas y externas, el contenido de la ampolla sellada se puede utilizar para otras determinaciones una vez terminada la medición de la IMC ¹⁹⁰.

Aunque la IMC presenta varias ventajas interesantes, también podemos encontrar algunos inconvenientes, como pueden ser los siguientes: i) equilibrio térmico, para obtener una alta sensibilidad y exactitud, los microcalorímetros isotérmicos requieren que tanto la muestra como las referencias estén precisamente a la temperatura deseada durante las mediciones. En la mayoría de los casos esto requiere un intervalo de equilibrio térmico que puede durar una hora aproximadamente durante el cual no se pueden obtener datos ii) cambios en el ambiente de los microorganismos, como ya hemos mencionado, las muestras se introducen en una ampolla sellada, por tanto, factores químicos como la depleción de oxígeno o la acumulación de los productos del metabolismo se tienen que tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados iii) datos no específicos, hay que tener en cuenta que la señal del flujo de calor es una señal neta no específica relacionada con la suma de todos los procesos químicos y físicos que tienen lugar en la ampolla de IMC, como consecuencia se podría estar midiendo calor de procesos desconocidos o incluso podrían estar ocurriendo simultáneamente procesos exotérmicos y endotérmicos ^{190,192}.

La IMC se ha utilizado en varios campos diferentes de la microbiología. Las aplicaciones en la microbiología clínica son un ejemplo de sus distintas posibilidades. Una aplicación importante sería la rápida detección de microorganismos, lo cual tendría gran relevancia a la hora de implementar el tratamiento dirigido. Algunos estudios han demostrado que con la IMC es posible detectar en pocas horas contaminación en plaquetas de sangre donadas ¹⁹³, pero también es posible determinar el efecto inhibitorio y/o la CMI de antimicrobianos y microorganismos en pocas horas ¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Además, los patrones de la señal a concentraciones inhibitorias y subinhibitorias nos proporcionan información sobre la naturaleza de la inhibición, es decir, si los antimicrobianos presentan un efecto bactericida o bacteriostático ¹⁹⁴. También nos permite diferenciar entre patógenos de relevancia clínica, por ejemplo, podemos utilizar la IMC para distinguir un *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina de uno resistente a la meticilina en poco tiempo (<5 horas) ¹⁹⁴. Por otro lado, ello podría ser útil en el estudio de los bacilos Gran negativos multirresistentes, incluyendo las EPCs. Además, la IMC ha demostrado ser una herramienta útil en los estudios de infecciones víricas y la actividad de los compuestos antivirales ^{197,198}.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

“La inspiración existe, pero tiene que encontrarte trabajando”

Pablo Picasso

La emergencia de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas (EPC) ha supuesto un reto diagnóstico para los Servicios/Laboratorios de Microbiología, siendo necesario conocer su expresión fenotípica, estructura poblacional, así como los elementos genéticos que portan los genes productores de estas enzimas. Asimismo, desde un punto de vista epidemiológico es preciso conocer la proporción de pacientes colonizados por este tipo de microorganismos para poder establecer medidas de control que evitan su diseminación.

Las EPC se detectaron por primera vez en nuestro hospital en el año 2005, siendo la primera epidemia descrita en España por enzimas de tipo VIM. En 2009 emergen en nuestro centro *Enterobacterales* productoras de KPC, siendo las primeras cepas con esta característica descritas en España. Con posterioridad, en 2012 se detectaron por primera vez en nuestro centro las *Enterobacterales* productoras de OXA-48.

Por otra parte, y debido al perfil de multirresistencia que presentan las EPC es necesario disponer en los Servicios/Laboratorios de Microbiología de técnicas innovadoras rápidas para el estudio de sensibilidad y que también respondan a la necesidad clínica de la realización de estudios de sinergias (combinación de antimicrobianos).

Ante este complejo escenario epidemiológico y la necesidad de disponer de nuevas herramientas que de forma rápida proporcionen información de sensibilidad a los antimicrobianos, los objetivos que se plantearon en la presente Tesis fueron:

1. Estudiar la proporción de pacientes ingresados en nuestro hospital y de pacientes procedentes del ámbito extrahospitalario de nuestra área portadores fecales de aislados de *Enterobacterales* productores de carbapenemasa, en una situación epidemiológica en nuestro centro de endemidad por aislados productores de enzimas VIM y de emergencia de enzimas KPC.
2. Actualizar la epidemiología y caracterización microbiológica (fenotipo de sensibilidad, determinantes de resistencia, elementos de transmisión horizontal y estructura poblacional) de los aislados de *Escherichia coli* y de *Klebsiella pneumoniae* productores de VIM en nuestro centro tras el brote descrito en 2005.
3. Caracterizar la estructura poblacional, el perfil plasmídico y los fenotipos de sensibilidad de los aislados de *Enterobacterales* productores de OXA-48 emergentes en nuestro hospital en el seno de un brote epidémico y que con posterioridad se transformó en un problema endémico.
4. Validar la técnica de calorimetría empleando el sistema CalScreener® para la determinación de los valores de CMI en comparación con los obtenidos por microdilución en caldo en una colección de aislados de *Enterobacterales* multirresistentes, incluyendo los productores de carbapenemasas así como su potencial utilización en los estudios de sinergia. Este objetivo se desarrolló en el seno del proyecto H2020 (Proyecto BADGER, Ref 784514).

MATERIAL Y MÉTODOS

“La única manera de hacer un buen trabajo es amar lo que haces. Si no lo has encontrado, sigue buscando, no te conformes”

Steve Jobs

1. Muestras para el aislamiento de enterobacterias productoras de carbapenemasas

Las EPCs analizadas en esta tesis se aislaron a partir de muestras de heces de pacientes hospitalizados y extrahospitalarios y de muestras de otras localizaciones clínicas. El estudio fue aprobado por el comité ético del hospital (Referencia CEIC 210/06)

1.1 Muestras de heces de pacientes portadores

El estudio de portadores fecales de EPCs se realizó entre julio de 2009 y enero de 2010 analizándose su presencia en un total de 500 muestras fecales de 474 pacientes (35% pacientes hospitalizados y 65% ambulatorios). A efectos de comparación, también se incluyeron en esta tesis los resultados obtenidos en el estudio realizado en 2006 donde se analizaron 600 muestras fecales de 569 pacientes (80% fueron pacientes hospitalizados y 20% ambulatorios).

Todas las muestras fueron procesadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal y fueron remitidas para la búsqueda de microorganismos enteropatógenos o detección de *Clostridioides difficile*.

1.2 Aislados clínicos de enterobacterias productoras de carbapenemasas

Entre 2008 y 2013, se incluyeron todos los aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* obtenidos de muestras clínicas que presentaban un fenotipo compatible con la producción de MBL y una sensibilidad disminuida a carbapenems de acuerdo con los puntos de corte clínicos de EUCAST publicados con anterioridad a 2015 (tabla 3).

A partir de 2012, tras la emergencia en el Hospital Ramón y Cajal de enterobacterias productoras de OXA-48, se incluyeron además todos los aislados con un fenotipo compatible con la producción de este tipo de carbapenemasa. Para ello se siguieron los criterios publicados por la SEIMC en 2011¹⁹⁹ y posteriormente por EUCAST en 2013²⁰⁰. Se incluyeron aislados que mostraron un perfil de resistencia a las penicilinas y sus asociaciones con inhibidores de betalactamasas de clase A, fueron sensibles o resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro, presentaron pérdida de sensibilidad al menos a uno de los carbapenems estudiados y mostraron un resultado positivo compatible con la presencia de una carbapenemasa pero negativo para la producción de una MBL (ver apartado 4.1).

Tabla 3. Puntos de corte de EUCAST (2014) para carbapenems en Enterobacterias (www.eucast.org).

Carbapenems	CMI (mg/L)		Contenido del disco (μ g)	Halo de inhibición (mm)	
	S \leq	R>		S \leq	R>
Doripenem	1	2	10	24	21
Ertapenem	0,5	1	10	25	22
Imipenem	2	8	10	22	16
Meropenem	2	8	10	22	16

2. Procesamiento de las muestras

Muestras de heces. Se procesaron un total de 1.100 muestras. De cada una de ellas, un total de 0,5 g de heces se homogenizaron en 3 ml de suero salino, inoculando una alícuota de 100 μ l en 2 ml de caldo Luria-Bertani (LB) (Pronadisa, Madrid, España) suplementado con 1 mg/L de imipenem. Posteriormente, se sembró una alícuota de 100 μ l en placas de agar MacConkey (MCK) (Oxoid Ltd, Basingstoke, RU) suplementadas con 4 mg/L de ceftazidima. Los tubos se incubaron durante 24 h y las placas durante 48 h a 37°C. Cada morfotipo de colonia crecida en agar MacConkey y cada cultivo positivo de caldo LB se subcultivaron en placas selectivas de MacConkey suplementadas con ceftazidima (1 mg/L) para los análisis posteriores (figura 7). Finalmente, se incluyeron en el estudio todos los aislados de un mismo paciente que presentaron morfología diferente en el agar.

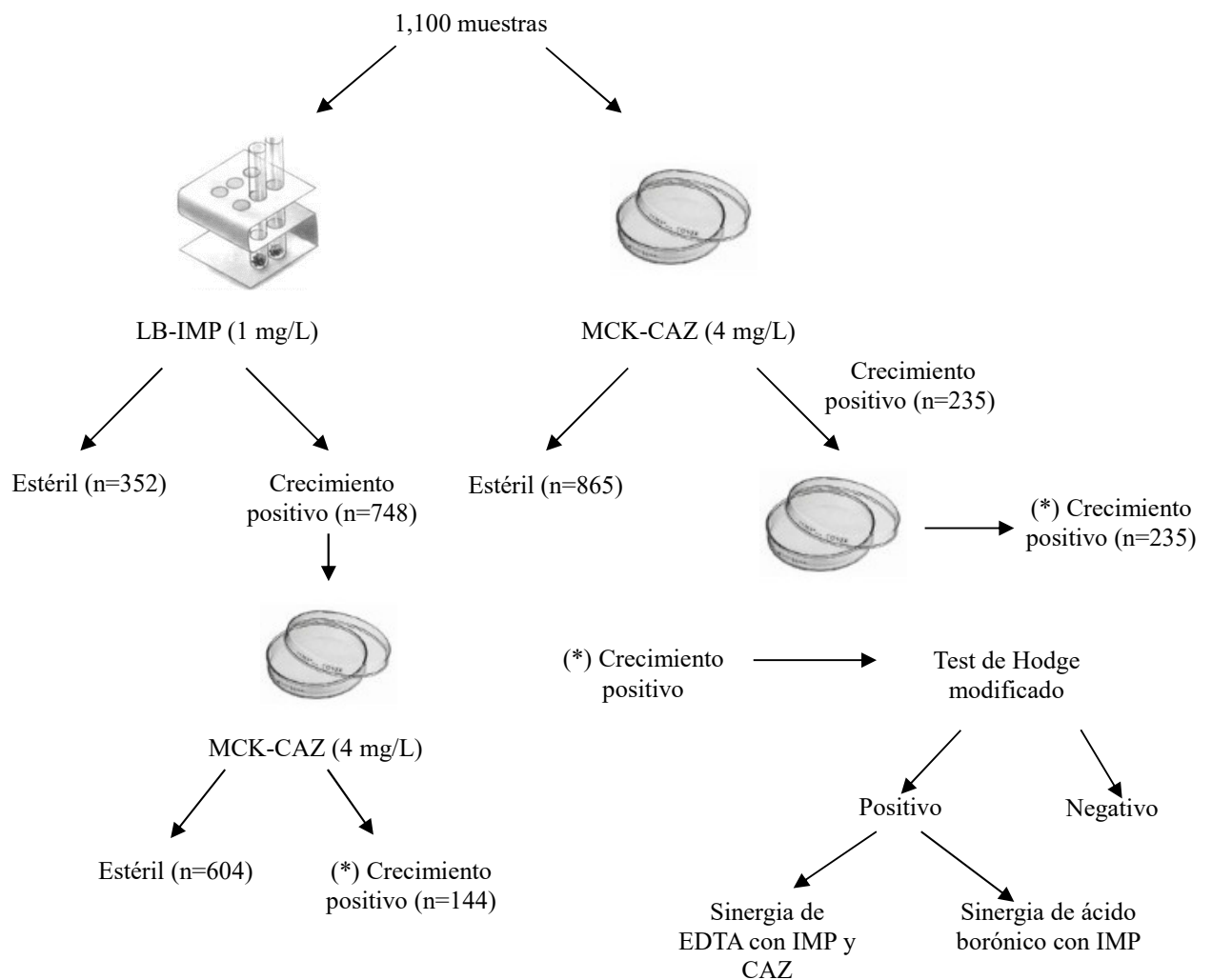
Muestras clínicas. Cada muestra clínica se procesó según los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) de la sección de Siembras del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal.

3. Identificación bacteriana y perfil de sensibilidad a antimicrobianos

La identificación de los microorganismos y la sensibilidad a los distintos antimicrobianos se realizó con el sistema semiautomático de microdilución WIDER (Fco. Soria Melguizo, Madrid, España) hasta octubre de 2011 y con el sistema automático de microdilución MicroScan (Beckman Coulter, CA, EE.UU) a partir de octubre de 2011. Ambos sistemas utilizan paneles con sustratos para la identificación bioquímica de los microorganismos y con antimicrobianos con concentraciones de antimicrobianos en base 2 para la determinación de la CMI. El inóculo utilizado (5×10^4 UFC/ml) es el recomendado por EUCAST, realizándose la lectura de los paneles tras 18 h de incubación a 35°C.

La identificación bacteriana se confirmó mediante espectrometría de masas utilizando el sistema MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Alemania) cuyo instrumento Microflex LT usa los softwares Flexcontrol 3.0 y MALDI BioTyper 2.0.

Figura 7. Representación esquemática del procesamiento de las muestras fecales. Un total de 1.100 suspensiones fecales se cultivaron en agar MacConkey suplementado con 4 mg/L de cef-tazidima (MCK-CAZ) y en caldo Luria-Bertani suplementado con 1 mg/L de imipenem (LB-IMP). Los cultivos positivos de LB-IMP se subcultivaron en placas de MCK-CAZ. Las colonias crecidas en ambas placas de MCK-CAZ fueron sometidas al cribado de la producción de carbapenemasas.



4. Detección fenotípica de la producción de carbapenemasas y de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

4.1 Detección fenotípica de la producción de carbapenemasas.

La confirmación del fenotipo productor de carbapenemasa se infirió de acuerdo al perfil de sensibilidad y los resultados de los Tests de Hodge modificado (THM) y las pruebas colorimétricas CarbaNP ^{201,202}. El THM se basa en la inactivación de los carbapenems por la cepa productora de carbapenemasa, permitiendo así el crecimiento de un microorganismo indicador sensible (*E. coli* ATCC25922) a los lados de una estría efectuada con la cepa productora, en una placa con un disco de carbapenem (figura 8). El test CarbaNP es un método colorimétrico basado en la hidrólisis de imipenem en presencia de carbapenemasa (figura 9).

Tras la confirmación de la producción de carbapenemasa se realizó una diferenciación fenotípica para la identificación de los diferentes tipos de enzimas. Así, la presencia de MBL se infirió mediante la prueba de doble difusión con discos de carbapenems y EDTA que consiste en colocar un disco de imipenem (10 µg) y otro de ceftazidima (30 µg) a 20 mm de un disco con 1,9 mg de EDTA ¹⁶². La aparición de un halo ampliado alrededor de los discos de imipenem y/o ceftazidima en la zona próxima al disco de EDTA, tras incubación de 18-20h a 37° C es indicativa de la posible producción de MBL (figura 10). La presencia de KPC se infirió mediante el incremento de al menos 5 mm de la zona de inhibición de un disco de meropenem comparado con un disco de meropenem suplementado con 0,3 mg de ácido borónico (figura 11). La presencia de OXA-48 se sospechó por la ausencia de halo de inhibición en un disco de temocilina ²⁰⁰. En la figura 12 se representa el algoritmo utilizado para la detección de carbapenemasas.

Figura 8. Test de Hodge modificado

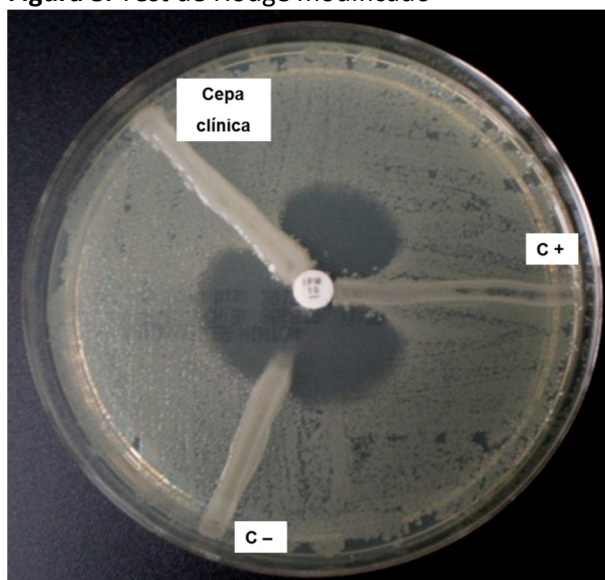


Figura 9. Test CarbaNP

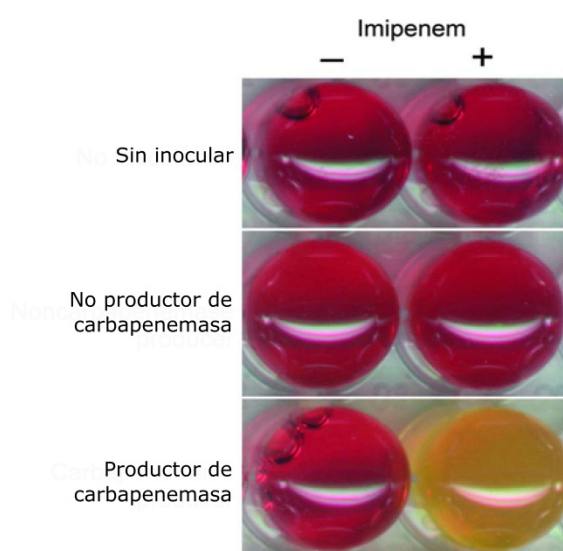


Figura 10. Doble difusión con discos de carbapenems y EDTA

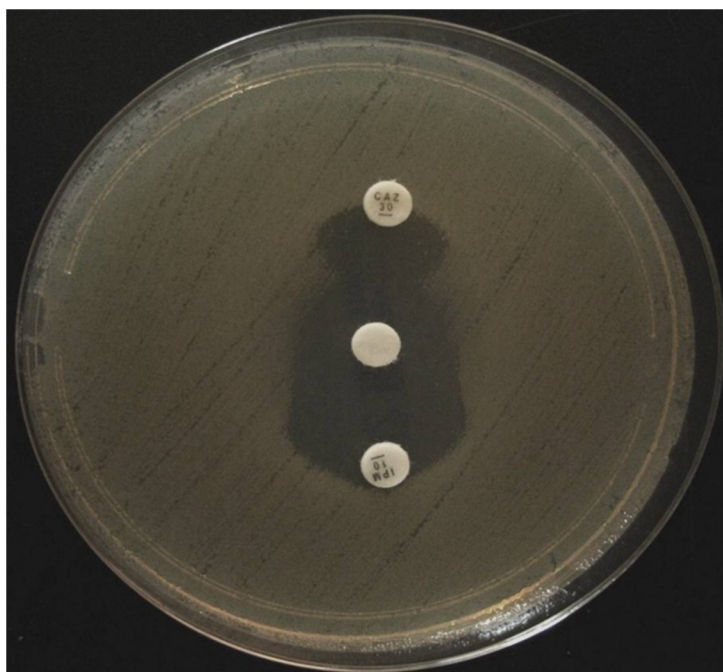


Figura 11. Inhibición por la acción del ácido borónico

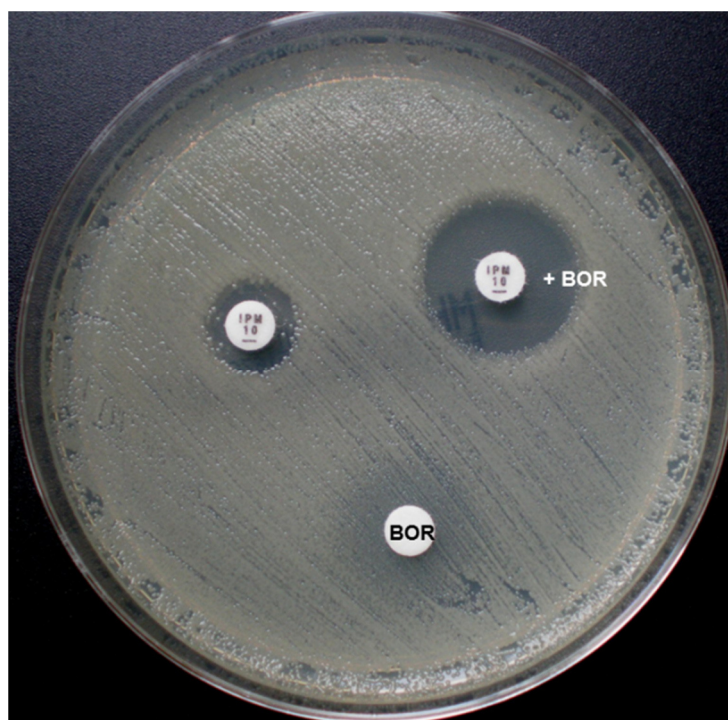
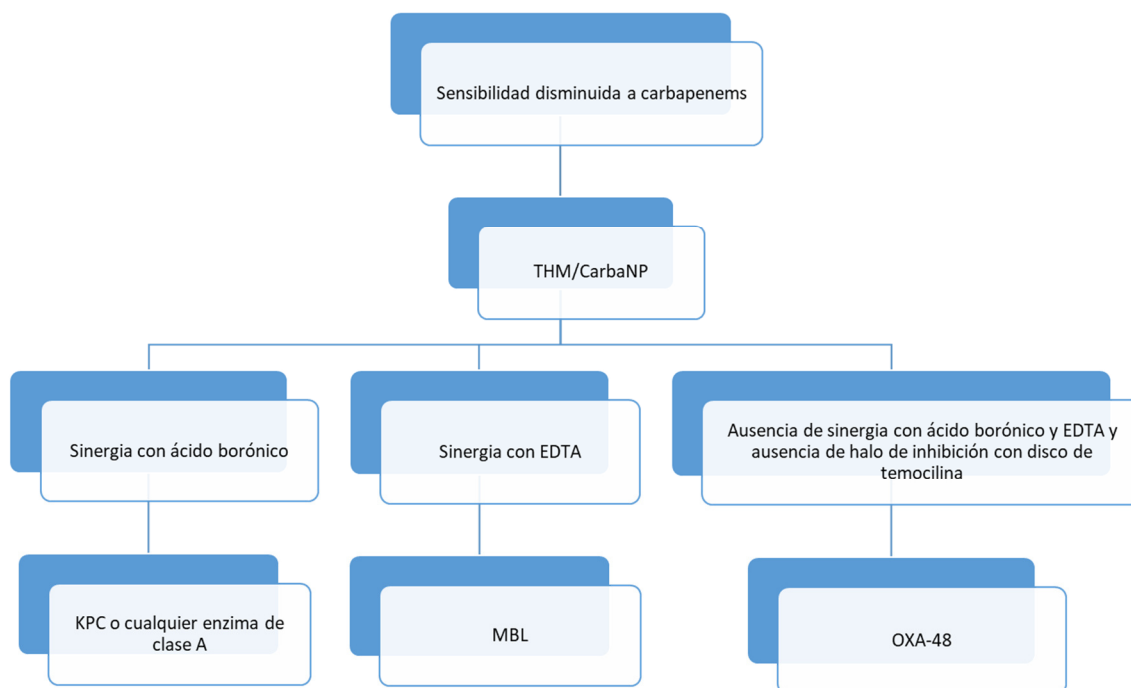
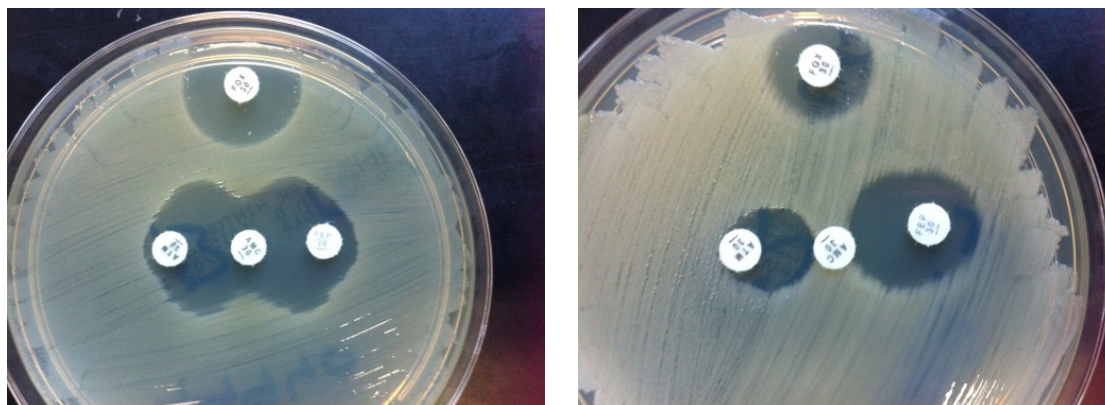


Figura 12. Algoritmo para la detección de carbapenemasas (adaptado de www.eucast.org).

4.2 Detección fenotípica de la producción de BLEE.

La posible presencia de BLEE se llevó a cabo mediante la prueba de doble difusión con discos que consiste en situar un disco de amoxicilina-clavulánico (20/10 µg) próximo a discos de cefotaxima (30 µg) y ceftazidima (30 µg) (antibióticos indicadores) ²⁰⁰. La producción de BLEE se demuestra por la ampliación del halo de inhibición de cualquiera de los indicadores por la acción del ácido clavulánico (figura 13).

Figura 13. Método de la doble difusión con discos para inferir la presencia de BLEE.

5. Extracción de ADN

ADN genómico. La extracción de ADN genómico procedente de cepas salvajes se realizó por los métodos de hervido o por un método comercial. El ADN obtenido se utilizó para la amplificación de los distintos genes *bla*_{BLEE} y *bla*_{carbapenemasa} y los estudios de clonalidad (PFGE y MLST).

En el **método de hervido**, basado en la extracción por calor, se resuspendió un inóculo bacteriano de cultivo en placa de agar LB (Pronidisa, Madrid, España) de 24h en 300 µl de agua estéril, y se hirvió durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante que se utilizó para posteriores estudios.

El **método comercial** utilizado fue Dneasy Blood and Tissue kit (QiagenGmbt, Hilden, Alemania). Un inóculo bacteriano se resuspendió en una solución de lisis y se trató la muestra con proteinasa K (20 mg/L). El lisado bacteriano se centrifugó y el sobrenadante se purificó con columnas de sílice donde el ADN se adsorbe específicamente. Finalmente se lavó la columna para eliminar posibles contaminantes y se eluyó el ADN con agua estéril.

La **extracción de ADN *in situ***, en la que el ADN se embebe en agarosa, se realizó a partir de un cultivo de 18-20h en 1 ml de caldo LB. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos y las células se resuspendieron en 500 µl de tampón cloruro sódico-EDTA (SE; 75 mMNaCl, 25 mM EDTA pH=8). Se mezcló con 500 µl de agarosa D5 (Pronadisa, Madrid, España) fundida en tampón Tris-Borato-EDTA, TBE 0,5x (44,5 mM Tris base, 44,5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH=8) para obtener bloques de agarosa. Tras la solidificación de los bloques, se procedió a la lisis y desproteinización celular con una solución de lisis (sarcosil 1%, proteinasa K 50 mg/L y completar volumen con EDTA 0,5 M pH=9,6). Los bloques de agarosa se incubaron con esta solución de lisis durante 24h a 56°C en agitación. Posteriormente, se realizaron 3 lavados, uno a 56°C y los dos restantes a temperatura ambiente con tampón TrisHCl-EDTA (TE; 10 mM Tris HCl pH=8; 0,1 mM EDTA pH=8) durante 15 minutos cada uno. Tras los lavados, los bloques de agarosa se conservaron en tampón TE a 4°C.

ADN plasmídico. La obtención de plásmidos se realizó con el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly²⁰³ y el método de Barton²⁰⁴.

El método de la **lisis alcalina de Birnboim y Doly** se basa en la diferente resistencia a valores de pH básicos del ADN plasmídico y cromosómico²⁰³. La lisis celular y desnaturalización del ADN plasmídico y cromosómico se produce por una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS 1%) y NaOH (0,2 N). La neutralización con acetato potásico (3 M, pH=5,0) permite que el ADN plasmídico vuelva a su configuración covalente circular cerrada y por tanto permanezca soluble, mientras el ADN cromosómico y las proteínas precipitan en un complejo formado por potasio y SDS que se elimina por centrifugación. El ADN plasmídico en el sobrenadante se purifica con una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (1:1:24) y una solución de cloroformo. El ADN plasmídico se recupera por precipitación con una solución de etanol-acetato potásico (1:10) y finalmente se concentra por precipitación con etanol. Este método se utiliza para la extracción de plásmidos de alto o medio número de copias y tamaños menores de 50 kb. Existen versiones comerciales basadas en este método que usan resinas de intercambio iónico como método de purificación. En esta tesis se utilizó el método comercial QIAGEN Plasmid Midi kit (Qiagen). Se

realizó un pre-inóculo de cultivo bacteriano de 5 ml de caldo LB suplementado con imipenem (0,5 µl) que se incubó durante 6 h a 37°C en agitación. Posteriormente, se realizó un inóculo 1:5 del cultivo anterior en caldo LB suplementado con el antibiótico en las mismas concentraciones y se incubó 18 h a 37°C. A partir de este cultivo se continuó con la extracción siguiendo las indicaciones del fabricante. Este método permite la obtención de plásmidos de bajo número de copias y alto peso molecular (hasta 150 Kb).

El **método de Barton** consiste en el análisis mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) de ADN genómico digerido con S1 nucleasa. Esta enzima digiere totalmente el ADN cromosómico y lineariza el ADN plasmídico superenrollado, lo que permite su separación mediante PFGE, donde la migración en estos geles es proporcional a su tamaño y comparable a los marcadores de peso molecular utilizados.

5.1 Separación de ADN y visualización

La separación de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa de corriente continua o de corriente alterna.

5.1.1 Electroforesis en corriente continua

En esta electroforesis se aplica un campo eléctrico de corriente continua que permite separar fragmentos de ADN comprendidos entre 10 pb y 50 Kb. La resolución de esta técnica para fragmentos mayores de 20 Kb es baja. En esta tesis se ha utilizado para separar fragmentos de productos de PCR amplificados y plásmidos, digeridos o sin digerir. La técnica se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a) Preparación de geles de agarosa. La agarosa utilizada fue D-1 Low EEO (Pronadisa) que por su baja electroendosmosis (0,05-0,13%) permite una gran movilidad. Los geles se prepararon en tampón TBE 0,5x a distintas concentraciones dependiendo del tamaño del fragmento a separar (0,8%-2,0% peso/volumen). Para los fragmentos de tamaños comprendidos entre 1 Kb y 10 Kb se utilizaron geles de agarosa del 0,8% y para los tamaños entre 100 pb y 1 Kb geles del 2%.
- b) Electroforesis. Los pocillos de los geles se cargaron con volúmenes variables de ADN (2-4 µl para los productos de PCR y 15-30 µl para plásmidos) mezclado con 2-5 µl de tampón de carga. La separación de los fragmentos se realizó en una cubeta horizontal, con tampón TBE 0,5x a 100 V durante 30 minutos en el caso de productos de PCR y 4 horas para la separación de ADN plasmídico. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron λ -EcoT14 I/Bgl II digest (60-2392 pb) y 100 bp DNA ladder (100-1.500 pb) (TaKaRa Bio Inc.).

5.1.2 Electroforesis en corriente alterna o electroforesis de campo pulsado (PFGE)

Esta electroforesis utiliza un gradiente de corriente alterna que permite la resolución de moléculas de alto peso molecular (desde 20 Kb hasta 10 Mb). Los distintos pulsos eléctricos que se producen permiten la reorientación y migración de los fragmentos según su peso molecular.

Los pasos a seguir antes de la separación son: extracción del ADN *in situ* en bloques de agarosa, digestión con diferentes enzimas de restricción dependiendo del tipo de estudio y preparación del gel.

- a) Preparación de geles de agarosa: para separar los fragmentos de ADN se cargaron los geles, previamente digeridos, en un gel de agarosa D5 (Pronadisa) al 1,2% en TBE 0,5x. Las características de la agarosa utilizada permiten una separación óptima de los distintos fragmentos, puesto que su bajo valor de electroendósmosis (<120) permite una mayor movilidad electroforética.
- b) Electroforesis de campo pulsado (PFGE): la separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en el sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, La Jolla, CA, EEUU) aplicando las siguientes condiciones: 14° C, 6 V/cm² y condiciones de electroforesis diferentes según el estudio a realizar. Para la digestión con *Xba*I (TaKaRa Bio Inc.), 5-40 s durante 24 h y para la digestión con S1 nucleasa (TaKaRa Bio Inc.), 5-25 s durante 5 h y una rampa de 30-45 s durante 15 h. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron: Lambda Ladder PFG Marker (48,5-1000,18 Kb) y Low Range PFG Marker (0,13-194 Kb) (New England Biolabs, Inc).

La visualización de los fragmentos separados por electroforesis se realizó hasta abril de 2013 por tinción de los geles con bromuro de etidio a una concentración final de 0,2 mg/L. A partir de mayo de 2013 los geles se tiñeron con gelRedTM Nucleic Acid Gel Stain 10.000X (Biotium Inc., Fremont, California, EE.UU.).

El bromuro de etidio es un agente que se intercala en el ADN y permite la visualización de las moléculas de ácido nucleico mediante la luz ultravioleta. Los geles de agarosa destinados a la separación de productos de PCR se prepararon con bromuro de etidio. Sin embargo, los destinados a la separación de plásmidos o fragmentos de ADN por PFGE se tiñeron después de la electroforesis (10-15 minutos) para evitar que las moléculas intercaladas con el bromuro de etidio se degraden por efecto de la luz ultravioleta. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con el equipo Gel Logic 100 Imaging system (Carestream Health Inc., Rochester, NY, EEUU).

El gelRed es un colorante fluorescente de ácidos nucleicos muy sensible, estable y ambientalmente seguro, ha sido diseñado para sustituir al bromuro de etidio ya que se ha demostrado que no es citotóxico ni mutagénico. Su estructura es un secreto comercial bajo patente, pero se puede resumir de la siguiente manera: i) dos núcleos aromáticos que le confieren la capacidad intercalante, esto es, que tiene afinidad para unirse al ADN pues se introduce entre sus bases apiladas. Esto se debe a su geometría plana y estructura aromática que interacciona favorablemente con el interior hidrófobo de la doble cadena. ii) Una cadena alifática larga que hace de

conector entre ambos núcleos intercalantes. iii) Su ligera carga positiva facilita su unión al ADN. Su utilidad deriva de su fluorescencia. En forma libre, los núcleos aromáticos interactúan entre sí y la molécula apenas es fluorescente. Al unirse al ADN, los núcleos se separan, y al encontrarse en un entorno hidrófobo, emiten una intensa fluorescencia. Se excitan con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y emiten luz visible de color rojo.

5.2 Purificación y secuenciación de ADN

Los productos de PCR se purificaron con QIAquick PCR purification kit (Qiagen GmbH) o con ExoSAP-IT® purification kit (USB Corp., Cleveland, OH, EEUU) para los productos de PCR obtenidos en los estudios de clonalidad por MLST. La secuenciación se realizó mediante el secuenciador automático ABI Prism 377 (PE, Norwalk, CONN, EEUU).

6. Caracterización de los genes *bla*_{BLEE} y *bla*_{carbapenemasa}

Para la determinación de los distintos tipos de BLEE y carbapenemasas se llevó a cabo la ampliación por PCR de los correspondientes genes, purificación, secuenciación de los productos de PCR obtenidos y análisis de las secuencias obtenidas (ver apartado 5).

La amplificación de los genes *bla*_{BLEE} se realizó en primer lugar mediante una PCR múltiple con distintos cebadores para las diferentes variantes y posteriormente se confirmó mediante una PCR simple con cebadores específicos para cada uno de los tipos de BLEE (tabla 4).

La amplificación de los genes *bla*_{carbapenemasa} se realizó primero mediante una PCR múltiple con distintos cebadores para las distintas variantes y posterior confirmación mediante una PCR simple con cebadores específicos para cada uno de los tipos de carbapenemasa (tabla 5).

7. Caracterización de los entornos genéticos de *bla*_{VIM}

La caracterización de los integrones de clase 1 donde se encuentra el gen *bla*_{VIM-1} se realizó mediante PCR y secuenciación. Posteriormente, se compararon los patrones de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) obtenidos mediante PCR y posterior digestión con *DraI*. Cada integrón que mostró un patrón diferente de RFLP se secuenció utilizando cebadores descritos con anterioridad (tabla 6) ²⁰⁵.

Tabla 4. Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización de los genes *bla_{BLEE}*

PCR	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Condiciones	Referencias
PCR MÚLTIPLE SHV	SHV-SE SHV-AS	ATGCGTTATATTCGCCTGTG TGCTTTTATTGGGCCAA	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, 2 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	206
TEM	TEM-164 TEM-165	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT		
CTX-M	CTX-MU1 CTX-MU-2	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC TGGGTRAARTARGTSACCCAGAAAYCAGCGG		
PCR MÚLTIPLE Grupo CTX-M-1	CTX-M-1-FW CTX-M-1-RW	AAAAATCACTGCGCCAGTTC AGCTTATTCAATCGCCACGTT		
Grupo CTX-M-2	CTX-M-2-FW CTX-M-2-RW	CGACGCTACCCCTGCTATT CCAGCGTCAGATTTTTCAGG	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 25 s a 94°C, 40 s a 52°C, 50 s a 72°C; extensión final de 6 min a 72°C	207
Grupo CTX-M-9	CTX-M-9-FW CTX-M-9-RW	CAAAGAGAGTGCAACGGATG ATTGGAAAGCGTTCATCACC		
PCR ESPECÍFICAS <i>bla_{SHV}</i>	SHV-FW SHV-RW	GGGTTATTCTTATTTGTGCG TTAGCGTTGCCAGTGCTC	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	208
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-SEQ-F TEM-SEQ-R	GCGGAACCCCTATTTG ACCAATGCTTAATCAGTGAG	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	209
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	CTX-M-1-SEQ-F CTX-M-1-SEQ-R	CCCATGGTTAAAAAATCACTGC CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	210
<i>bla_{CTX-M-2}</i>	P3 P2b	ATGATGACTCAGAGCATTGG TCCCGACGGCTTCCGCCTT	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	211
<i>bla_{CTX-M-9}</i>	CTX-M-9-SEQ-F CTX-M-9-SEQ-R	TGGTGACAAAAGAGAGTGCAACG TCACAGCCCTTCGGCGAT	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	212

Tabla 5. Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización de los genes *bla_{carbapenemasa}*

PCR	Cebador	Secuencia	Condiciones	Referencia
PCR Múltiple VIM	VIM-F VIM-R	GATGGTGTGGTGGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	1 ciclo de 10 min a 94°C; 36 ciclos de 30 s a 94°C, 40 s a 52°C, 50 s a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	213
OXA	OXA-F OXA-R	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG		
NDM	NDM-F NDM-R	GGTTGGCGATCTGTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC		
KPC	KPC-F KPC-R	CGTCTAGTTCTGCTGCTTG CTTGTCATCCTTTAGGCG		
PCR Simple VIM	VIM-F VIM-R	ATGGTGTTGGTGGCATATC TGGGCCATTGAGCCAGATC	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	214
OXA-48	OXA-48-F OXA-48-R	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	215

Tabla 6. Cebadores utilizados para la caracterización del entorno genético de *bla_{VIM}*

Cebador	Secuencia	Nº Acceso GeneBank	Posición (nt)	Referencia
VIM-F	ATGGTGTGTTGGTCGCGATATC	AY987853	251-270	162
VIM-R	TGGGCCATTGAGCCAGATC	AY987853	760-742	162
5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	AF17413	5298-5314	216
3'CS	AAGCAGACTTGACCTGAT	AF17413	6306-62-89	216
<i>qacED1-R</i>	CAAGCTTTTGCCCATGAAGC	AF17413	6608-6588	216
<i>aadA1-F</i>	GCTGGCCGTACATTTGTACG	AY987853	2127-2146	162
VIM-Rf	GATCTGGCTGAATGGCCCA	AY987853	742-760	162
<i>aacA4-F</i>	AGCGAACACGCAGTGATGC	AY987853	1541-1558	162
<i>intI1-F</i>	GGGTCAAGGATCTGGATTTCG	AF17413	4774-4754	216
<i>intI1-R</i>	ACATGCGTGTAATCATCGTCG	AF17413	4312-4333	216
<i>qacED1-F</i>	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	AF17413	6383-6392	216

8. Caracterización plasmídica

La caracterización de plásmidos incluyó la determinación y tamaño, identificación del grupo de incompatibilidad y análisis de los patrones de restricción obtenidos por digestión enzimática.

Los plásmidos se obtuvieron mediante los métodos de lisis alcalina de Birnboim y Doly y el método de Barton (ver apartado 5).

Para visualizar el tamaño y número de plásmidos de las cepas transconjugantes se llevó a cabo el método de Barton donde el tamaño y el número de plásmidos se establece por comparación con los marcadores de peso molecular utilizados en la movilidad electroforética de las formas lineales después de la digestión con S1 nucleasa (12 U) y de su separación mediante PFGE (ver apartados 5 y 5.1.2).

Para determinar las relaciones entre los distintos perfiles de plásmidos se realizaron digestiones con las siguientes enzimas: *EcoRI*, *PstI*, *HpaI* y *DraI* (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japón) en las condiciones indicadas por el fabricante. La obtención del ADN, la separación de los fragmentos y su visualización se describen en los apartados 5 y 5.1. Los patrones obtenidos se compararon con el programa informático Bionumerics v7.5 (Applied Maths NV, Bélgica) para determinar si los plásmidos estaban o no relacionados genéticamente. No existen criterios que determinen cuál es el número de bandas que tienen que compartir para que se consideren idénticos.

Los plásmidos portadores de los genes *bla_{carbapenemasa}* se clasificaron en función de su grupo de incompatibilidad que se infirió de acuerdo a las proteínas iniciadoras de replicación (*replication initiator protein*, *RIP*) y a los genes codificantes de relaxasas, para ello se utilizaron varios esquemas de PCR descritos en la literatura ²¹⁷⁻²¹⁹. Para profundizar en la caracterización de los plásmidos portadores de OXA-48, se amplificaron mediante PCR los genes relacionados con la replicación (*repA*), conjugación (*traU*) y el mantenimiento (*parA*), asociados previamente con la presencia de carbapenemasas ⁸⁰ (tabla 7). El esquema descrito por Carattoli y cols. ²¹⁷, permite la identificación de 18 replicones básicos representativos de los plásmidos de enterobacterias e

incluye 5 PCR múltiples y 3 simples. El esquema descrito por Compain y cols.²¹⁸, permite la identificación de 28 amplicones utilizando como diana los genes que codifican las relaxasas e incluye 6 PCR múltiples y una simple. Por último, el esquema descrito por Villa y cols.²¹⁹ se basa en el análisis *in silico* de 90 plásmidos del grupo IncF, se analizan las secuencias de los replicones FII, FIA, FIB y FIC disponibles en GenBank y se propone un esquema de secuencia tipo de replicón IncF con el objetivo de clasificar a todos los miembros de la gran familia IncF mediante una aproximación basada en la secuencia del replicón.

Los cebadores y condiciones utilizados se muestran en la tabla 8. Para la amplificación se utilizó como molde ADN plasmídico obtenido por el método de Birnboim y Doly (ver apartado 5). El procedimiento seguido se describe en los apartados 5.1.1 y 5.2. La correspondencia entre el replicón descrito y el plásmido que lleva el gen *bla*_{carbapenemasa} se llevó a cabo mediante hibridación con sondas rel²¹⁸ específicas (ver apartado 8.2) de ADN digerido con S1 nucleasa o *I-CeuI* (New England Biolabs, Inc) transferido por el método *Southern blot*. La coincidencia de señal entre la hibridación de la sonda del gen *bla*_{carbapenemasa} y de la sonda rel en el mismo fragmento de ADN mostró la asociación entre ambos.

8.1 Transferencia de los genes *bla*_{carbapenemasa}

El método utilizado para la transferencia *in vitro* de los genes *bla*_{carbapenemasa} fue la conjugación en medio sólido. La cepa utilizada como receptora fue *E. coli* BM21 (resistente a ácido nalidíxico y rifampicina, lactosa positiva y libre de plásmidos).

Partiendo de un cultivo en caldo LB de 18 h de las cepas donadoras y receptoras se procedió a la dilución 1:100 en caldo LB poniendo en contacto donadoras y receptoras en una proporción 1:2. La mezcla se centrifugó a 6.000 rpm durante 15 minutos y las células se resuspendieron en 100 µl de caldo LB. Se inoculó a un filtro (Millipore, Billerica, MA, EEUU) colocado sobre una placa de agar LB que actuó como soporte sólido y nutricional que fue incubada a 37°C durante 18 h. Posteriormente, se estiró un asa en placas de agar LB suplementado con imipenem (1 mg/L) y rifampicina (100 mg/L). Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h. Los cultivos positivos se reestriaron en las mismas placas de selección y se incubaron a 37°C durante 18 h. Finalmente, los transconjugantes obtenidos se confirmaron por morfotipo, sinergia y por las resistencias asociadas.

Tabla 7. Caracterización de plásmidos portadores de OXA-48

Cebador	Secuencia	Condiciones	Referencia
RepA-F RepA-R	GACATTGAGTCAGTAGAAGG CGTGCGATTCGTCTTCGGC	1 ciclo de 7 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	80
TraU-F TraU-R	ATCTCACGCAATCTTACGTC TCGCGTCATGCGTGATCTTC		
ParA-F ParA-R	GCACTGAAAACGTTGATCAG GATCGCAATGCGTCTTGGTG		

Tabla 8. Cebadores y condiciones utilizados para la clasificación de plásmidos.

PCR	Tipo de plásmido	Cebador	Secuencia	Condiciones	Referencia
Multiplex 1	HI1	HI1-F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	217
	HI2	HI1-R	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
		HI2-F	TTTCTCTGAGTCACCTGTTAACAC		
	I1	HI2-R	GGTCACTACCGTTGTCATCCT		
		I1-F	CGAAGCCGGACGGCAGAA		
		I1-R	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
Multiplex 2	X	X-F	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT		
		X-R	TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTTAGC		
	L/M	L/M-F	GGATGAAAACTATCAGCATCTGAAG		
		L/M-R	CTGCAGGGCGATTCTTTAGG		
	N	N-F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG		
		N-R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
Multiplex 3	FIA	FIA-F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAAGGTG		
	FIB	FIA-R	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
		FIB-F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG		
	W	FIB-R	CTCCGTCGCTTCAGGGCATT		
		W-F	CCTAAGAACAACAAGCCCCCG		
		W-R	GGTGCGGGCATAGAACCGT		
Multiplex 4	Y	Y-F	AATTCAACAACACTGTGCAGCCTG		
	P	Y-R	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTTT		
		P-F	CTATGGCCCTGCAAAACGCCCAGAAAA		
	FIC	P-R	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
		FIC-F	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG		
		FIC-R	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		

Tabla 8. Cebadores y condiciones utilizados para la clasificación de plásmidos (continuación).

PCR	Tipo de plásmido	Cebador	Secuencia	Condiciones	Referencia
Multiplex 5	A/C	A/C-F	GAGAACCAAGACAAAAGACCTGGA	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	217
	T	A/C-R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCTT		
		T-F	TTGGCCTGTTTGTGCTTAAACCAT		
		T-R	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
	FIIAs	FIIAs-F	CTGTCGTAAGCTGATGGC		
Simple 1	K	FIIAs-R	CTCTGCCACAAACTTCAGC	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	217
		K-F	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAAC		
		K-R	TCTTTACGAGCCCGCCAAA		
Simple 2	B/O	B/O-F	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAAC	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 52°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	
		B/O-R	TCTGCGTTCGCGCAAGTTCGA		
Simple 3	F	F-F	TGATCGTTTAAGGAAATTTTG	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 52°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	
		F-R	GAAGATCAGTCACACCATCC		
Multiplex 1	FIIK FIA, FIB, FII FV	FIIK-F	CGATATTCTKGAACCCCGTA	1 ciclo de 15 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 90s a 60°C, y 90 s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	218
		FIIK-R	TCATTGCCCATATAATYCGTCC		
		F-tot-F	ATCAGGAMCCACAGTTACAC		
		F-tot-R	GTTTCATGATRTCRCGACTGAG		
		FV-F	CATCAAAAGCGAARGAGYAGTTCAC		
		FV-R	TTACCTCWCWGAATATATGRCGRA		

Tabla 8. Cebadores y condiciones utilizados para la clasificación de plásmidos (continuación).

PCR	Tipo de plásmido	Cebador	Secuencia	Condiciones	Referencia
Multiplex 2	N	N-F	CCAGTTAGAAACCCGATCA	1 ciclo de 15 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 90s a 60°C, y 90 s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	218
		N-R	CGTAATCGTCGTAAATGCTG		
	I1	I1-F	TTTAATCATGAGCAAAACGCC		
		I1-R	ACAACYCTGTCACCATAATC		
	L/M	L/M-F	TCGCTATATCGTTGGTGATG		
Multiplex 3		L/M-R	GGGTATGTTGGGCAATTTTC	1 ciclo de 15 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 90s a 60°C, y 90 s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	218
	A/C	A/C-F	TGATTGAGAAAGTGGGAACTC		
		A/C-R	CACACATAGGAGAACTCGT		
	HI1, HI2	HIα-F	CCAAAAGACTGACTTGGGAGCA		
		HIα-R	CCGAGTTAGCCATCAAGGAA		
Multiplex 4		HIβ-F	GATGTTATGTGGATAGTCCG	1 ciclo de 15 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 90s a 65°C, y 90 s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	218
	HI1	HIβ-R	GAATATGCCCTCACYATCGCT		
		HIγ-F	AATGACGTGGTTGAATACGA		
	HI2	HIγ-R	AGAA TAGAAATCAGCGGTCC		
Multiplex 4	X1	X1-F	GAAAATGGTCGTAAGTCAGCT	1 ciclo de 15 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 90s a 65°C, y 90 s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	218
		X1-R	TTCAGYCTGACAAGATCACCTGC		
	X2	X2-F	CGAAAATGGTCGTAAGTCTGCA		
	X3	X2-R	CATTACAAAAGCCCGTCTCTG		
		X3-F	TGTTGACAAAGGAATTCAGGGT		
Multiplex 4		X3-R	ATGGTCGTAGCCCAACATCAA	1 ciclo de 15 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 90s a 65°C, y 90 s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	218
	X4	X4-F	TTAAACGCGCTAAAAGGGACTGG		
		X4-R	GGGCAATATTTTCAATCTGCCAG		

Tabla 8. Cebadores y condiciones utilizados para la clasificación de plásmidos (continuación).

PCR	Tipo de plásmido	Cebador	Secuencia	Condiciones	Referencia
Multiplex 5	No tipable	MobC11-F	ACGGATTCGCTTRCCTGGMAGTG	1 ciclo de 15 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 90s a 65°C, y 90 s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	218
	No tipable	MobC11-R	TTCAGSGCGTACTGGTCGAGATCG		
		MobQu-F	TCTCCAGAARCAAGCGGCTACAG		
	colE, no tipable	MobQu-R	ATGGTCAGCCCATGATGCACGCCA		
		MobP5-1-F	AGTCCGGGARCTYATYGATGCCAC		
	colE, no tipable	MobP5-1-R	TATCAGRAGAGWGTCAGYRTCKGCG		
Multiplex 6	Q1	MobP5-2-F	TCCGGTGGAYTATCTKCTGGGKA	1 ciclo de 15 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 90s a 60°C, y 90 s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	218
		MobP5-2-R	AAGACTGYTCATARATRGCTCC		
		MobP5-3-F	GCTATCAGTCGCCCTGTTCTGTC		
		MobP5-3-R	AGTACCCGATCATCAGTCAGTG		
	U	Q1-F	GATTTATCACCTTACGGCGAA		
		Q1-R	TACCTCCGCAACTCTTTGG		
	P1α	U-F	TATGACACTCTAGCCGGGTT		
		U-R	TGGATCTTGTCTTCCCACGGTT		
	W	P1α-F	TGAAGTACATCACCGACGAG		
		P1α-R	GTTTCGTGATTGTCACGCTC		
Simple 1	B/O, K	W-F	CATCGAGTTCGATACCCCTTG	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1min a 94°C, 40s a 55°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	218
		W-R	GCCACATAGTAAACGTCCTT		
		BO/K-F	GAATGCCATYATTCGMMAMAA		
		BO/K-R	GTGATATACAGACCATCACTGG		

Tabla 8. Cebadores y condiciones utilizados para la clasificación de plásmidos (continuación).

PCR	Tipo de plásmido	Cebador	Secuencia	Condiciones	Referencia
Simple 1	FII	FII-F FII-R	CTGATCGTTTAAGGAATTT CACACCATCCTGCACTTA	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 54°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	219
Simple 2	FIA	FIA-F FIA-R	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
Simple 3	FIB	FIB-F FIB-R	TCTGTTTATTCTTTTACTGTCCAC CTCCCGTGGCTTCAGGGCATT		
Simple 4	FIC	FIC-F FIC-R	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		
Simple 5	FII _S	FII _S -F FII _S -R	CTAAAGAATTTTGATGGCTGGC CAGTCACTTCTGCCTGCAC	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	
Simple 6	FII _Y	FII _Y -F FII _Y -R	TGGYAGGGAACTGGTTCTG GTRAGTCACACCTTCCCGC		
Simple 7	FII _K	FII _K -F FII _K -R	TCTTCTTCAATCTTGGCGGA GCTTATGTTGCACRGAAGGA		

8.2 Localización de los genes *bla*_{BLEE} y *bla*_{carbapenemasa}

La localización cromosómica o plasmídica de los genes *bla*_{carbapenemasa} se determinó por hibridación de ADN digerido con *I*-*Ceu*I o S1 nucleasa, transferido por el método de *Southern blot* (ver 4.7). La obtención del ADN, su digestión, electroforesis y visualización se detallan en el apartado 5. En el caso de la digestión con *I*-*Ceu*I se utilizaron 6 U de la enzima y para S1 nucleasa 12 U. Los cebadores y condiciones utilizados para la síntesis de sondas se encuentran en las tablas 4 y 5.

La enzima *I*-*Ceu*I reconoce dianas de restricción de ADN cromosómico correspondientes a regiones específicas del operón 23S de genomas bacterianos. La sonda 16S rADN hibrida solamente con fragmentos de ADN cromosómico. Una hibridación positiva de la sonda 16S rADN y de la sonda del gen *bla*_{carbapenemasa} en el mismo fragmento indica la localización cromosómica del gen. Una hibridación positiva de la sonda *bla*_{carbapenemasa} en bandas que no hibridan con la sonda 16S rADN indica una localización plasmídica.

En el caso de ADN digerido con S1 nucleasa, la hibridación de la sonda *bla*_{carbapenemasa} en uno de los fragmentos generados tras la digestión enzimática será indicativo de localización plasmídica, además de indicarnos el tamaño del plásmido.

8.3 Secuenciación del plásmido pRYC-OXA-48

Los aislados de *K. pneumoniae* pertenecientes a la secuencia tipo ST11 se detectaron en nuestro hospital desde 2005 asociados a la producción de distintas carbapenemasas (VIM-1, KPC-3 y OXA-48). Debido a la importancia de este clon en nuestro centro y en la epidemiología de las carbapenemasas ^{220,221} se seleccionó, en base a su fenotipo y genotipo, un aislado de *K. pneumoniae*-ST11 productor de OXA-48 y CTX-M-15 para la secuenciación de su genoma completo. La secuenciación del genoma se realizó utilizando el equipo Illumina (cobertura 900x) y los fragmentos de DNA se ensamblaron de novo con Velvet y Spade ²²². Además, también se secuenció utilizando PacBio y ensambló con RS HGAP Assembly 2.

Se combinaron las secuencias obtenidas mediante Illumina y PacBio y utilizando un programa diseñado específicamente para ello

(Era7, <https://era7bioinformatics.com/es/index.cfm>), se cerró el genoma de este aislado ^{223–226} y el proyecto de secuenciación del genoma completo se depositó en DDBJ/ENA/GenBank con el número de acceso VILG000000000, la versión descrita en esta tesis es VILG01000000. Una vez cerrado el genoma se identificó el plásmido portador de OXA-48 y se comparó, utilizando BRIG y MAUVE, con plásmidos indexados en la base de datos del NCBI (números de acceso de GenBank: JN626286.1, KC335143.1, KC354801.1 y NC021502.1) (<http://brig.sourceforge.net>) ²²⁷.

9. Estructura poblacional

La caracterización de la estructura poblacional de los aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de carbapenemasas se realizó empleando las técnicas de PFGE y MLST utilizando los esquemas descritos para cada especie bacteriana.

9.1 Electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE)

Para determinar la relación clonal existente entre las diferentes cepas se llevó a cabo una electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE) mediante el protocolo modificado de Kaufmann, según lo especificado en el apartado 5²²⁸.

La digestión del ADN en bloques de agarosa se realizó con 30 U de la enzima *XbaI* (TaKaRa Bio Inc.) y con incubación a 37° C durante 20 h. La relación clonal entre los aislados se estableció por comparación visual de los patrones obtenidos aplicando los criterios previamente establecidos²²⁹, que permiten clasificar los aislados en indistinguibles (sin diferencia de bandas); clonalmente relacionados (entre 1 y 3 bandas de diferencia); posiblemente relacionados (4 y 6 bandas de diferencia); no relacionados clonalmente (más de 7 bandas de diferencia).

9.2 Multilocus sequence typing (MLST)

Esta técnica consiste en amplificar y comparar las secuencias de siete genes de mantenimiento celular (“housekeeping”) asignando un número a cada alelo. Las distintas combinaciones de alelos se asignaron con su correspondiente ST según las bases de datos correspondientes a cada microorganismo. Se determinó la relación clonal en los aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli*.

9.2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Los aislados clínicos productores de carbapenemasas (OXA-48, n=60; VIM-1, n=52) y los aislados procedentes de portadores fecales de carbapenemasas (n=8) se caracterizaron por MLST según el esquema descrito por Diancourt y cols.²³⁰. Dicho esquema se basa en la amplificación de los siguientes genes “housekeeping”: *rpoB* (subunidad beta ARN polimerasa), *gapA* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *pgi* (fosfoglucosaisomerasa), *phoE* (fosforina E), *infB* (factor iniciador de la traducción 2) y *tonB* (transductor de energía periplásmico) (<http://bigsd.dbweb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

Los cebadores y condiciones utilizados se muestran en la tabla 9. La obtención del ADN, amplificación, electroforesis, visualización, purificación, secuenciación de los productos obtenidos, así como el análisis posterior de las secuencias y de los resultados del MLST se llevó a cabo como se indica en el apartado 5.

9.2.2 *Escherichia coli*

Los aislados clínicos productores de carbapenemasas (OXA-48, n=5; VIM-1, n=20) y los aislados procedentes de portadores fecales de carbapenemasas (n=2) se caracterizaron por MLST según el esquema descrito por Wirth y cols.²³¹. Los genes utilizados fueron: *adk* (adenilato quinasa), *fumC* (fumaratohidratasa), *gyrB* (ADN girasa), *icd* (isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *purA* (adenilosuccinato deshidrogenasa) y *recA* (motivo de unión de ATP/GTP) (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). Los cebadores y condiciones utilizados se muestran en la tabla 10. Los procedimientos utilizados se describen en el apartado 5.

Tabla 9. Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización por MLST de *K. pneumoniae*

230

PCR	Cebador	Secuencia	Condiciones
<i>rpoB</i>	RpoF RpoR	GCGGAAATGGCWGAGAACCA GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>gapA</i>	gapF gapR	TGAAATATGACTCCACTCACGG CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>mdh</i>	mdhF mdhR	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>Pgi</i>	pgiF pgiR	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>phoE</i>	phoF phoR	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>infB</i>	infF infR	CTCGCTGCTGGACTATATTCG CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>tonB</i>	tonF tonR	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT ATTCGCCGGCTGRGCTGAGAG	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 45°C, 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C

Tabla 10. Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización por MLST de *E. coli*²³¹

PCR	Cebador	Secuencia	Condiciones	
<i>adk</i>	adkF adkR	ATTCTGCTTGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTCGCGTATTT	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 54°C, 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	
<i>fumC</i>	fumCF fumCR	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC TAAGCTGTGG	TCCCGGCAGA-	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 54°C, 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>gyrB</i>	gyrBF gyrBR	TCGGCGACACGGATGACGGC ATCAGGCCTTCACGCGCATC		1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>icd</i>	icdF icdR	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT		1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 54°C, 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>mdh</i>	mdhF mdhR	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATA- TCTTTCTT		1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>purA</i>	purAF purAR	TCGGTAACGGTGTTGTGCTG CATACGGTAAGCCACGCAGA		1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 54°C, 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>recA</i>	recAF recAR	CGCATTCGCTTTACCCTGACC TCGTGCAAATCTACGGACCGGA		1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 58°C, 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C

10. Calorimetría (calScreener®)

Esta parte del trabajo fue financiado en parte por el proyecto Europeo H2020-SMEInst-2-2016-2017 (*grant agreement 784514*) titulado “*CalScreener®: an innovative device for Bacterial Analysis and Diagnostics through Growth and Energy-release in Real-time*”. Para llevar a cabo los distintos estudios se establecieron tres apartados:

- Validación del sistema CalScreener® (Symcel Sverige AB, Spånga, Suecia) (figura 14) para la determinación de las CMI en comparación con los valores de CMI obtenidos por el sistema estándar de microdilución.
- Validación del estudio de CMI empleando el sistema CalScreener® con microorganismos multirresistentes productores de BLEE y/o carbapenemasas.
- Validación de los estudios de sinergia antibiótica empleando el sistema CalScreener® en comparación con el método de tablero de ajedrez en una selección de microorganismos multirresistentes.

Figura 14. Calorímetro calScreener®



10.1 Microorganismos estudiados

Todas las cepas utilizadas fueron aisladas de hemocultivos enviados al Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal durante el año 2018. Para la validación inicial del sistema CalScreener® se utilizaron 40 aislados de *E. coli* (n=20) y *K. pneumoniae* (n=20) y además se incluyeron seis cepas de referencia con sensibilidad conocida y mecanismos de resistencia bien caracterizados (tabla 11).

Para la segunda parte, validación de la CMI con microorganismos multirresistentes se incluyeron 20 aislados de *E. coli* (n=10) y *K. pneumoniae* (n=10) que presentaban en su mayoría BLEE y/o carbapenemasas (tabla 12). Los mecanismos de resistencia fueron caracterizados siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6 de esta tesis. Finalmente, de esta colección de cepas multirresistentes se seleccionaron 7 cepas en función del valor de CMI de amikacina (5 *K. pneumoniae* y 2 *E. coli*; rango CMI_(AK): ≤4->16 mg/L) para incluirlas en el estudio de las sinergias (tabla 12), las cepas que nos interesaban para dicho estudio fueron aquellas con valores de CMI_(AK) elevados (valores de CMI=> 8 mg/L (n=1); 16 mg/L (n=3); >16 mg/L (n=2) y ≤4 mg/L (n=1), a pesar de que este aislado no mostró resistencia a amikacina se introdujo en el estudio de sinergia por ser productor de OXA-48).

Tabla 11. Cepas de referencia utilizadas en la validación de CalScreener®.

Cepa de referencia	Características
<i>E. coli</i> NCTC 13476	Productor de metalo-betalactamasa (IMP-1)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Fenotipo salvaje, sensible a todos los grupos de antibióticos
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13438	Productor de carbapenemasa (KPC-3)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	Productor de ESBL (SHV-18)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Fenotipo salvaje (AmpC inducible), sensible a colistina
<i>A. baumannii</i> ATCC19606	Fenotipo salvaje, sensible a colistina

10.2 Antimicrobianos empleados

Para los estudios de validación de la técnica de determinación de la CMI con el sistema calScreener® y su utilidad con aislados multirresistentes (primera y segunda parte) se utilizaron los siguientes antimicrobianos y rangos de concentraciones: piperacilina-tazobactam (PTZ, 2-32 mg/L), cefotaxima (CTX, 0,12-4 mg/L), meropenem (MER, 0,06-16 mg/L), amikacina (AK, 4-16 mg/L) y ciprofloxacina (CP, 0,03-1 mg/L) (tabla 13). En el caso de los estudios de sinergia antibiótica los rangos de concentraciones y antibióticos empleados fueron: 0,5-16 mg/L para meropenem, 0,25-2 mg/L para colistina y 4-16 mg/L para amikacina estudiándose las combinaciones de meropenem-colistina y meropenem-amikacina (tablas 14 y 15).

10.3 Microdilución estándar y preparación del inóculo

Para el cálculo de los valores de CMI estándar se siguió la norma ISO 20776-1:2006 interpretándose los valores según los criterios de EUCAST de 2018 (www.eucast.org). Para la realización del inóculo se preparó una suspensión correspondiente al 0,5 de la escala de McFarland (1,5x10⁸ UFC/ml) que se diluyó 1:100 en caldo Muller-Hinton II con concentración de cationes ajustada

(Becton Dickinson [BD], Sparks, MD, EE.UU) para alcanzar una concentración final de 10^6 UFC/pocillo. Se emplearon placas de 96 pocillos de fondo redondo con un volumen final de 300 μ l (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, EE.UU) que se incubaron durante 18-20 horas a 37°C.

Tabla 12. Características de los aislados con algún MR utilizados en CalScreener®.

Nº muestra*	Fenotipo de resistencia	Mecanismo de resistencia	Secuencia tipo
<i>E. coli</i> 11	CTX, FEP, ATM, AK ^a , CP	CTX-M-15	131
<i>E. coli</i> 12	CTX, CAZ, FEP, ATM, TB, CP	CTX-M-15	131
<i>E. coli</i> 13	PTZ ^a , CTX, CAZ, FEP, ATM, TB, CP	CTX-M-15	131
<i>E. coli</i> 14	CTX, FEP, ATM, CP	CTX-M; TEM-1	95
<i>E. coli</i> 15	CTX, FEP, TB, AK ^a , CP	CTX-M-15; TEM-1	131
<i>E. coli</i> 16	PTZ ^a , GM, TB, CP	IRT**	88
<i>E. coli</i> 17	PTZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, IMP, ETP, TB, AK ^a , CP	CTX-M-15; OXA-48	131
<i>E. coli</i> 18	PTZ, GM, TB, CP	IRT**; TEM-1	354
<i>E. coli</i> 19	PTZ, ETP, GM, CP	OXA-48	131
<i>E. coli</i> 20	CTX, CAZ ^a , FEP, ATM, CP	CTX-M	131
<i>K. pneumoniae</i> 11	PTZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, IMP, ETP, GM, TB, CP	CTX-M-15; KPC-3	307
<i>K. pneumoniae</i> 12	PTZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, IMP, ETP, GM, TB, AK, CP	AmpC plasmídica; pérdida de porinas**	147
<i>K. pneumoniae</i> 13	CTX, CAZ, FEP, ATM, TB, AK ^a , CP	CTX-M-15	307
<i>K. pneumoniae</i> 14	PTZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, IMP, ETP, GM, TB, AK, CP	AmpC plasmídica; pérdida de porinas**	147
<i>K. pneumoniae</i> 15	PTZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, IMP, ETP, GM, TB, CP	CTX-M-15; OXA-48	11
<i>K. pneumoniae</i> 16	PTZa, CTX, CAZ, FEP, AZT, TB, AK ^a , CP	CTX-M-15	15
<i>K. pneumoniae</i> 17	PTZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, ETP, GM, TB, CP	CTX-M-15; KPC-3	307
<i>K. pneumoniae</i> 18	PTZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, IMP, ETP, GM, TB, CP	CTX-M-15; OXA-48	11
<i>K. pneumoniae</i> 19	PTZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, IMP, ETP, GM, TB, CP	CTX-M-15; KPC-3	307
<i>K. pneumoniae</i> 20	PTZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, IMP, ETP	KPC-3	45

Abreviaturas: PTZ, piperacilina-tazobactam; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IMP, imipenem; ETP, ertapenem; GM, gentamicina; TB, tobramicina; AK, amikacina; CP, ciprofloxacino; MR: mecanismo de resistencia.

*En negrita se muestran los aislados utilizados para los estudios de sinergia.

** Mecanismo de resistencia inferido.

^a Interpretación de la CMI: intermedio.

10.4 Determinación de los valores de CMI con el sistema calScreener®

Para realizar los experimentos de microcalorimetría, de los 300 µL de las suspensiones realizadas por microdilución, se transfirieron 120 µL a un vial de plástico diseñado específicamente para ser insertado en copas de titanio que posteriormente se cerraron herméticamente creando un sistema de incubación individual (figura 15) dispuestas en una placa denominada “calPlate”.

La placa de “calPlate” está formada por 48 copas de titanio [16 de referencia, donde solo se inocula caldo Müller-Hinton (MH) y 32 muestras]. La placa “calPlate” se introdujo en el CalScreener® (figura 16) y se incubó hasta 18 h. Los sensores empiezan a medir la producción de calor en cada muestra de manera individual tras un período de 1 hora de estabilización. El diseño final de la placa calPlate se recoge en la tabla 13.

Los valores de CMI se infieren a partir de los valores de flujo de calor producidos a lo largo del tiempo empleando el software CalView (Symcel Sverige AB, Spånga, Suecia). Dicho programa genera los termogramas, es decir, las curvas de los valores de calor emitido por el metabolismo bacteriano a lo largo del tiempo. Estos termogramas son equiparables a las curvas de crecimiento (figura 17) que quedarían modificadas proporcionalmente cuando el inóculo bacteriano se expone a diferentes concentraciones de un antimicrobiano. Esta equiparación fue realizada previamente por la empresa Symcel al desarrollar el programa CalView.

Tabla 13. Diseño de calPlate para los estudios de validación del método y de la CMI.

Referencia*	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia
PTZ-32	PTZ-16	PTZ-8	PTZ-4	PTZ-2	AK-16	AK-8	AK-4
MER-16	MER-8	MER-4	MER-2	MER-1	MER-0.5	MER-0.25	MER-0.12
CP-1	CP-0.5	CP-0.25	CP-0.12	CP-0.06	CP-0.03	POS1	MER-0.06
NEG	CTX-4	CTX-2	CTX-1	CTX-0.5	CTX-0.25	CTX-0.12	POS2
Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia

Abreviaturas: PTZ, piperacilina-tazobactam; AK, amikacina; MER, meropenem; CP, ciprofloxacino; CTX, cefotaxima; POS1, control positivo 1; POS2, control positivo 2; NEG, control negativo.

*Estas celdas sólo contienen caldo MH.

Figura 15. A) Transferencia del inóculo bacteriano al vial de plástico. B) Vial de plástico y copa de titanio. C) “CalPlate”



Figura 16. A) Introducción de calPlate en calScreener®. B) Tecnología calScreener®.

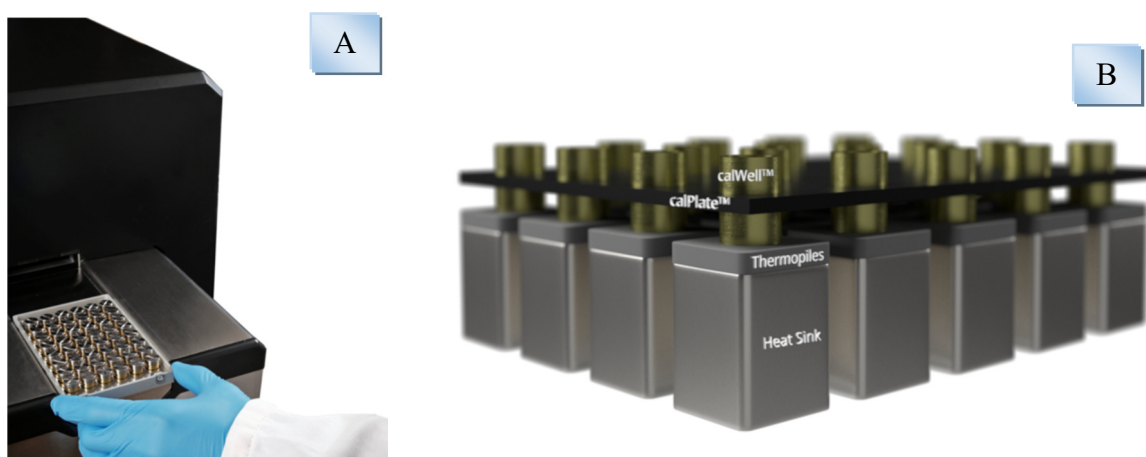
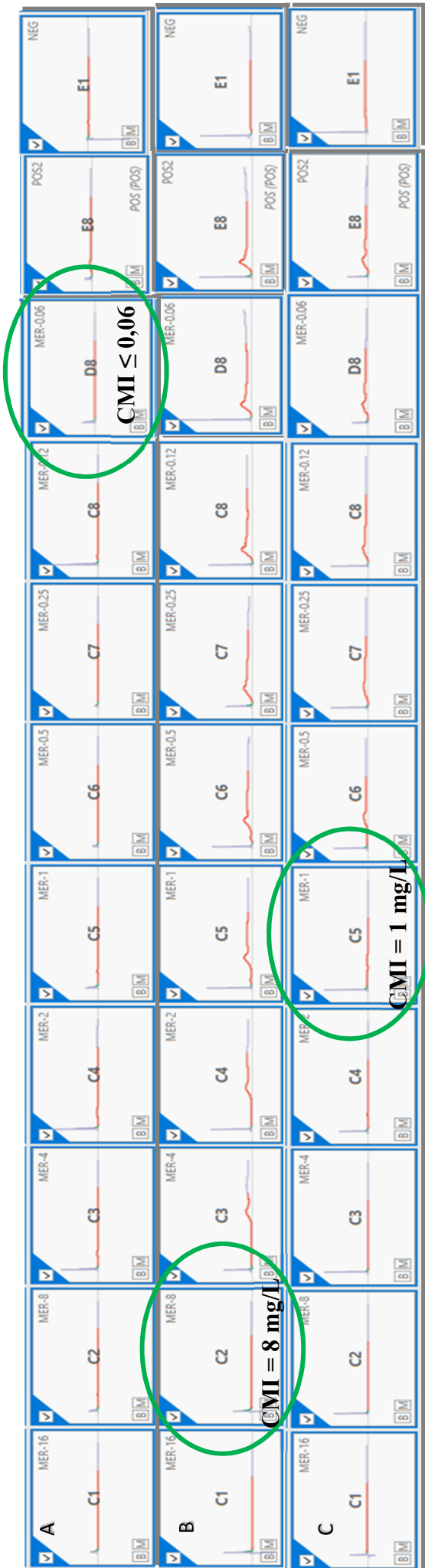


Figura 17. Software calView para el análisis de los resultados obtenidos con calScreener®

i) Aislados de *E. coli* con distinta CMI para meropenem.



A) *E. coli* con $CMI_{(MER)} \leq 0,06$ mg/L. Los pocillos C1 a C8 y D8 corresponden a las distintas concentraciones de meropenem, el pocillo E8 es el control positivo y el E1 es el control negativo. B) *K. pneumoniae* con $CMI_{(MER)} = 8$ mg/L. Los pocillos C1 a C8 y D8 corresponden a las distintas concentraciones de meropenem, el pocillo E8 es el control positivo y el E1 es el control negativo. C) *K. pneumoniae* con $CMI_{(MER)} = 1$ mg/L. Los pocillos C1 a C8 y D8 corresponden a las distintas concentraciones de meropenem, el pocillo E8 es el control positivo y el E1 es el control negativo.

- ii) Aislados de *K. pneumoniae* con distinta CMI para ciprofloxacino.



D) *K. pneumoniae* con $CMI_{(cr)} \leq 0,03$ mg/L. Los pocillos D1 a D6 corresponden a las distintas concentraciones de ciprofloxacino, el pocillo D7 es el control positivo y el E1 es el control negativo. E) *K. pneumoniae* con $CMI_{(cr)} > 1$ mg/L. Los pocillos D1 a D6 corresponden a las distintas concentraciones de ciprofloxacino, el pocillo E8 es el control positivo y el E1 es el control negativo. F) *K. pneumoniae* con $CMI_{(cr)} = 0,5$ mg/L. Los pocillos D1 a D6 corresponden a las distintas concentraciones de ciprofloxacino, el pocillo D7 es el control positivo y el E1 es el control negativo.

10.5 Análisis de los resultados de CMI

Para la comparación de los resultados de CMI obtenidos en el estudio de validación de CalScreener® frente a la microdilución estándar se calcularon los siguientes valores diagnósticos: acuerdo esencial (AE), acuerdo categórico (AC) y errores graves (EG), mayores (EM) y menores (EMe).

Se consideró que hubo AE cuando el resultado de la CMI obtenida por microcalorimetría, no varió en más de ± 1 dilución respecto a la obtenida por el método de referencia. Se consideró que hubo AC cuando la interpretación de sensibilidad (S o R) empleando CalScreener®, coincidió con la interpretación por el método de referencia.

Las discrepancias entre los resultados fueron categorizadas como EG cuando el microorganismo fue clasificado como sensible por el método de referencia y resistente por CalScreener® (falsa resistencia); EM cuando la microcalorimetría clasificó el microorganismo como sensible y el método de referencia como resistente (falsa sensibilidad) y EMe cuando hubo un cambio de sensible a intermedio, de intermedio a resistente o viceversa.

Las fórmulas empleadas fueron las siguientes:

$$AE = \frac{N^{\circ} \text{ aislados con CMI con el sistema calScreener}^{\circledR} \text{ dentro de } \pm 1 \text{ dilución del valor de referencia}}{N^{\circ} \text{ total de aislados}} \times 100$$

$$AC = \frac{N^{\circ} \text{ aislados clasificados con la misma categoría clínica con el sistema de calScreener}^{\circledR} \text{ y los valores de referencia}}{N^{\circ} \text{ total de aislados}} \times 100$$

$$EG = \frac{N^{\circ} \text{ aislados con discrepancias graves}}{N^{\circ} \text{ aislados resistentes por el método de referencia}} \times 100$$

$$EM = \frac{N^{\circ} \text{ aislados con discrepancias graves}}{N^{\circ} \text{ aislados sensibles por el método de referencia}} \times 100$$

$$EMe = \frac{N^{\circ} \text{ aislados con discrepancias}}{N^{\circ} \text{ total de aislados}} \times 100$$

10.6 Estudio de sinergia mediante la técnica de tablero de ajedrez

Para llevar a cabo el estudio de sinergia se empleó la técnica de tablero de ajedrez, que es una técnica sencilla pero laboriosa, muy utilizada para estudiar el efecto de las combinaciones de antibióticos. Para ello, colocamos las diluciones del antimicrobiano 1 en el eje X en las siguientes concentraciones: 0,5; 1; 2; 4; 8 y 16 mg/L. En el eje Y colocamos por un lado concentraciones de amikacina de 4; 8 y 16 mg/L y por otro lado concentraciones de colistina de 0,5; 1 y 2 mg/L para *K. pneumoniae* y 0,25; 0,5 y 1 mg/L para *E. coli*.

10.7 Estudio de sinergia con el sistema calScreener®

En el estudio de sinergia se utilizó el mismo principio que para la determinación de los valores de CMI empleando para ello el programa calView. El diseño del calPlate empleado se recoge en las tablas 14 (combinación MER-AK) y 15 (combinación MER-COL).

Tabla 14. Diseño de calPlate para los estudios de sinergia antibiótica con amikacina y meropenem

Referencia*	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia
POS1	MER1	MER2	MER3	MER4	MER5	MER6	POS2
AK1	A1 M1	A1 M2	A1 M3	A1 M4	A1 M5	A1 M6	NEG
AK2	A2 M1	A2 M2	A2 M3	A2 M4	A2 M5	A2 M6	NEG
AK3	A3 M1	A3 M2	A3 M3	A3 M4	A3 M5	A3 M6	NEG
Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia

Abreviaturas: POS1, control positivo 1; POS2, control positivo 2; MER1, meropenem 0.5 mg/L; MER2, meropenem 1 mg/L; MER3, meropenem 2 mg/L; MER4, meropenem 4 mg/L; MER5, meropenem 8 mg/L; MER6, meropenem 16 mg/L; AK1; amikacina 4 mg/L; AK2, amikacina 8 mg/L; AK3, amikacina 16 mg/L.

*Estas celdas sólo contienen caldo MH

Tabla 15. Diseño de calPlate para los estudios de sinergia antibiótica con colistina y meropenem

Referencia*	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia
POS1	MER1	MER2	MER3	MER4	MER5	MER6	POS2
COL1	C1 M1	C1 M2	C1 M3	C1 M4	C1 M5	C1 M6	NEG
COL2	C2 M1	C2 M2	C2 M3	C2 M4	C2 M5	C2 M6	NEG
COL3	C3 M1	C3 M2	C3 M3	C3 M4	C3 M5	C3 M6	NEG
Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia

Abreviaturas: POS1, control positivo 1; POS2, control positivo 2; MER1, meropenem 0.5 mg/L; MER2, meropenem 1 mg/L; MER3, meropenem 2 mg/L; MER4, meropenem 4 mg/L; MER5, meropenem 8 mg/L; MER6, meropenem 16 mg/L; COL1; colistina 0, 5 mg/L; COL2, colistina 1 mg/L; COL3, colistina 2 mg/L para *K. pneumoniae* (COL1, colistina 0,25 mg/L; COL2, colistina 0,5 mg/L; COL3, colistina 1 mg/L para *E. coli*).

*Estas celdas sólo contienen caldo MH

10.8 Análisis de los resultados de sinergia

El análisis de la validación de los estudios de sinergia se llevó a cabo mediante el cálculo de la concentración inhibitoria fraccionada (CIF).

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\Sigma \text{CIF} = \frac{\text{CMI}(\text{MER})c}{\text{CMI}(\text{MER})} + \frac{\text{CMI}(\text{X})c}{\text{CMI}(\text{X})}$$

Donde **CMI(MER)** representa la CMI de meropenem, **CMI(MER)c** representa la CMI de meropenem en la combinación, **CMI(X)** representa la CMI de colistina o amikacina y **CMI(X)c** representa la CMI de colistina o amikacina en la combinación. Se consideró que hubo sinergia cuando $\Sigma \text{CIF} \leq 0.5$ y antagonismo cuando la $\Sigma \text{CIF} > 4$.

Asimismo, el análisis de concordancia entre las dos técnicas se realizó por el método de Bland-Altman²³². Este método bioestadístico consiste en un gráfico de dispersión que evalúa la concordancia entre dos métodos. Se representa la diferencia entre cada pareja de valores (A-B en la ordenada) frente a la media de cada pareja de valores (A+B)/2 en el eje de abscisas. Con este método se evalúan las diferencias sistemáticas, líneas de tendencia y detección de valores extremos. En el caso de que los valores de CMI coincidan con ambos métodos, los puntos se distribuyen a lo largo de la línea central. Las líneas a un lado y otro de la línea central corresponden a ± 1 dilución de diferencia (acuerdo esencial). La línea discontinua representa la tendencia entre las dos variables (media y diferencia).

RESULTADOS

“He fallado una y otra vez en mi vida. Esa es la razón principal de mi éxito”

Michael Jordan

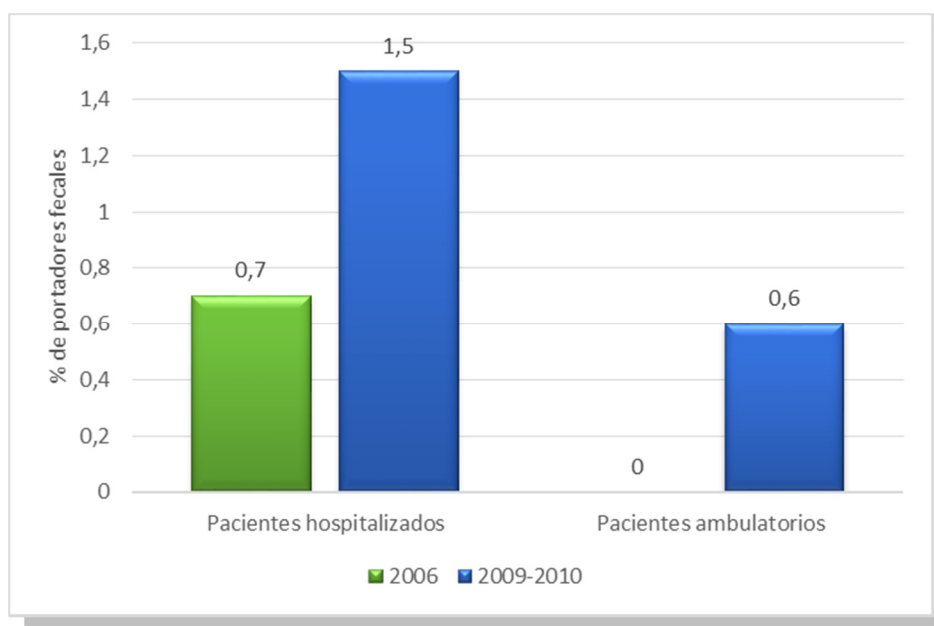
1. Estudio de vigilancia epidemiológica de carbapenemasas

En este apartado se analizan los resultados obtenidos en los estudios de colonización intestinal por EPC.

1.1 Prevalencia de portadores fecales y caracterización de carbapenemasas

El porcentaje de portadores fecales de enterobacterias productoras de carbapenemasas en pacientes atendidos en el Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, aumentó ligeramente de un 0,7% (4/569) en el año 2006 a un 1,5% (7/474) en el período 2009-2010 (figura 18), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,22$). Hay que destacar que, en este segundo período de estudio, se detectaron por primera vez en nuestra área geográfica EPC en pacientes ambulatorios (0,6%, 3/474).

Figura 18. Prevalencia de portadores fecales de carbapenemasas en 2006 y 2009-2010.



Durante el primer período (enero-abril 2006) a partir de las 600 muestras analizadas, se identificaron un total de 103 bacilos Gram negativos, de los cuales 40 aislados fueron BGNNF (tabla 16). Entre el resto de aislados identificados como enterobacterias ($n=63$), cuatro presentaron una sinergia positiva en el test de doble difusión con discos de carbapenems y EDTA, mostrando posteriormente PCR positiva para el gen *bla_{VIM}*. La secuenciación del producto de PCR demostró que todas ellas producían VIM-1. Los 4 aislados productores de VIM-1 se identificaron como *K. pneumoniae* ($n=2$) y *E. cloacae* ($n=2$) (tabla 17) y mostraron un patrón de PFGE igual que las cepas epidémicas (KPMBL-A-ST39 y ECMBL-A-) encontradas con anterioridad en nuestro hospital ¹⁶².

Estos aislados procedían de pacientes hospitalizados en Oncología, Cirugía Vascular, Cirugía General y Digestivo y en la UCI de Cardiovascular. Dos de estos pacientes, además de colonización presentaron infección por bacterias productoras de carbapenemasas. El primer paciente estaba ingresado en oncología e inicialmente se detectó colonización por *K. pneumoniae* (KPMBL-A) productora de VIM. Posteriormente, desarrolló una infección respiratoria por la misma cepa de *K. pneumoniae* (KPMBL-A). En el segundo paciente durante su ingreso en Cirugía General y Digestivo se detectó colonización y posteriormente infección respiratoria y bacteriemia por un aislado de *K. pneumoniae* (KPMBL-A).

Durante el segundo período (julio 2009-enero 2010), a partir de las 500 muestras analizadas se identificaron 176 bacilos Gram negativos. En 10 de estos aislados se confirmó la producción de MBL; dichos aislados pertenecían a 7 pacientes (6 mujeres y 1 hombre, con una edad media de 64 años, rango: 28-83 años), los cuales estaban hospitalizados en Medicina Interna (n=2), Nefrología (n=1) y Neurología (n=1) (tablas 16 y 17). Hay que destacar que los otros 3 pacientes eran ambulatorios y solo uno de ellos había estado previamente hospitalizado tres meses antes en un Servicio del área médica. Ninguno de estos pacientes presentó infección por enterobacterias productoras de MBL y no se demostró nexo epidemiológico alguno con otros pacientes infectados y/o colonizados por este tipo de microorganismos. Estos aislados se identificaron como *K. pneumoniae* (n=6; clones KPMBL-B, -C y -D), *E. coli* (n=2; clones ECOMBL-A y -B), *E. cloacae* (n=1) y *C. freundii* (n=1) (tabla 17). Uno de los pacientes ambulatorios estuvo colonizado al mismo tiempo por 3 aislados diferentes; un *C. freundii* y 2 *K. pneumoniae* que presentaron distinto morfotipo aunque pertenecían al mismo clon (KPMBL-D-ST163). Además, uno de los pacientes hospitalizados estuvo colonizado por un aislado de *K. pneumoniae* (KPMBL-C) y uno de *E. cloacae* (ECMBL-B) (tabla 17).

Siete aislados del primer período (1 *E. coli*, 1 *C. freundii* y 5 bacilos BGNNF) y 9 del segundo (2 *E. cloacae*, 6 *C. freundii* y 1 BGNNF) mostraron un resultado débilmente positivo para el THM. Por PCR no se confirmó la presencia de carbapenemasa y se consideraron como un resultado falso positivo. Esto podría ser debido a la producción de BLEE o hiperproducción de AmpC, ya que en estos dos períodos estudiados tampoco se detectaron carbapenemasas tipo NDM-, KPC-ni OXA-48 (tabla 16).

Entre las cepas productoras de VIM-1, en dos cepas de *K. pneumoniae* aisladas durante el primer período se detectó la presencia de SHV-12, mientras que en ninguna de las cepas aisladas durante el segundo período se detectaron enzimas de tipo BLEE.

Tabla 16. Identificación y caracterización fenotípica de los aislados procedentes de 1.100 muestras de heces.

Microorganismos (nº aislados 2006 / nº aislados 2009-2010)	Nº de aislados con						
	THM positivo		MBL-DDST positivo		MBL (tipo de carbapenemasa)		BLEE-DDST positivo
	2006	2009-2010	2006	2009-2010	2006	2009-2010	
<i>Escherichia coli</i> (29/64)	1	2	0	2	0	2 (VIM-1)	21 30
<i>Enterobacter cloacae</i> (8/18)	2	3	2	1	2 (VIM-1)	1 (VIM-1)	1 0
<i>Citrobacter freundii</i> (5/18)	1	7	0	1	0	1 (VIM-1)	0 1
<i>Morganella morganii</i> (9/13)	0	0	0	0	0	0	0 0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3/17)	2	6	2	6	2 (VIM-1)	6 (VIM-1)	1 3
<i>Hafnia alvei</i> (5/4)	0	0	0	0	0	0	0 0
<i>Klebsiella aerogenes</i> (1/2)	0	0	0	0	0	0	0 1
<i>Citrobacter amalonaticus</i> (1/0)	0	0	0	0	0	0	0 0
<i>Enterobacter asburiae</i> (1/0)	0	0	0	0	0	0	0 0
<i>Klebsiella oxytoca</i> (1/0)	0	0	0	0	0	0	0 0
BGNMF (40/40) ^a	5	1	5	0	0	0	0 0

Abreviaturas: BGNMF, bacilos Gram negativos no fermentadores; THM, test de Hodge modificado; MBL, metalo-betalactamasa; BLEE, betalactamasa de espectro extendido; DDST, test de sinergia de doble disco.
^a*Pseudomonas* spp. (10/7), *Stenotrophomonas maltophilia* (7/2), *Acinetobacter lwoffii* (6/2), *Sphingomonas paucimobilis* (1/0) y otros (16/29).

Tabla 17. Datos epidemiológicos de aislados de enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo VIM^a

Especie	PFGE	Identificación cepa	MLST	Pac	Servicio	Fecha aislamiento	Tamaño plásmido ^b	Grupo Inc	Tipo integrón	Corresistencias
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=8)	KPMBL-A	RYC034268	ST39	A	Oncología ^c	mar-06	<u>50</u> , 100, 250	N	B	Gm, Tb, Ak, Na, Fm, S/T
		RYC042800	ST39	B	CGD ^d	mar-06	<u>30</u> , 100, 250	N	B	Gm, Tb, Ak, Na, Cp, Fm, S/T
	KPMBL-B	RYC165502	ST688	C	Medicina Interna	nov-09	<u>50</u>	N	B	Fm, S/T
	KPMBL-D	RYC116749.1	ST253	D	Neurología	ago-09	<u>300</u>	HI2	A	Ninguna
		RYC197897	ST163	E	Medicina Interna	ene-10	<u>50</u>	N	B	Na, S/T
		RYC197365.2 ^e	ST163	F	Extrahospitalario ^f	ene-10	<u>50</u>	N	B	Fm, S/T
		RYC197365.3 ^e	ST163	F	Extrahospitalario ^f	ene-10	<u>50</u>	N	B	S/T
		RYC197894	ST163	G	Extrahospitalario	ene-10	<u>50</u>	N	B	Na, S/T
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=3)	ECMBL-A	RYC023986	-	H	UCI médica	feb-06	100, <u>300</u>	HI2	A	Na, Cp, Fm, S/T
		RYC035509	-	I	UCI cardiovascular	mar-06	100, <u>300</u>	HI2	A	Na, Fm, S/T
	ECMBL-B	RYC116749.2	-	D	Neurología	ago-09	<u>50</u> , 320	N	B	S/T
<i>Escherichia coli</i> (n=2)	ECOMBL-A	RYC115509	ST2441	J	Extrahospitalario	ago-09	<u>50</u>	N	B	Tb, S/T
	ECOMBL-B	RYC165481	ST155	K	Nefrología	nov-09	<u>50</u>	N	B	Tb, Na, Cp, S/T
<i>Citrobacter freundii</i> (n=1)	CFMBL-A	RYC197365.1	-	F	Extrahospitalario ^c	ene-10	<u>50</u>	N	B	Na, S/T

^aAbreviaturas: Pac, paciente; CGD, cirugía general y digestivo; UCI, unidad de cuidados intensivos; Na, ácido nalidíxico; Cp, ciprofloxacino; S/T, cotrimoxazol; Ak, amikacina; Gm, gentamicina; Tb, tobramicina; Fm, fosfomicina.
^bEn negrita se indica el tamaño del plásmido portador del gen *bla*_{VIM-1} determinado por hibridación, se subraya el plásmido que transfiere por conjugación.
^cPaciente con aislamientos clínicos (muestra respiratoria) de *K. pneumoniae* KPMBL-A
^dPaciente con aislamientos clínicos (muestra respiratoria y hemocultivos) de *K. pneumoniae* KPMBL-A
^eEn este paciente se aislaron dos aislados de *K. pneumoniae* que presentaron diferente morfotipo.
^fPaciente con ingreso previo (3 meses antes) en Gastroenterología.

1.2 Perfil de sensibilidad

Todos los aislados productores de VIM-1 (n=14) fueron resistentes a las combinaciones penicilina-inhibidor de penicilinasa y a las cefalosporinas de amplio espectro. Sin embargo, basándonos en los resultados de sensibilidad obtenidos mediante tiras en gradiente (Etest), algunos aislados presentaron valores de CMI categorizados como sensibles a imipenem (n= 13; rango de CMI, 0,25-3 mg/L), meropenem (n=13; rango de CMI, 0,125-4 mg/L), ertapenem (n=4; rango de CMI, 0,094-16 mg/L) y doripenem (n=10; rango de CMI, 0,094-12 mg/L). Además, utilizando los valores del punto de corte epidemiológico (ECOFF) de EUCAST, se observó que algunos aislados mostraron valores de CMI por encima del ECOFF para imipenem (5 aislados), meropenem (13 aislados), ertapenem (14 aislados) y doripenem (13 aislados), por lo que utilizando los valores ECOFF podríamos detectar mejor la presencia de mecanismos de resistencia. Asimismo y como ya se había descrito con anterioridad²³³, se observaron diferencias en los niveles de sensibilidad a los carbapenems entre aislados que pertenecieron al mismo clon. En la tabla 18 se muestran los valores de CMI obtenidos por Etest de los distintos clones.

Tabla 18. CMIs obtenidas mediante Etest de los aislados productores de VIM-1.

Pulsotipos	Imipenem	Meropenem	Ertapenem	Doripenem
KPMBL-A	0,75	1,5	1,5	3
KPMBL-A	3	4	16	12
KPMBL-B	0,25	0,25	0,19	0,19
KPMBL-C	0,75	1	1	1
KPMBL-D	0,75	0,38	1,5	0,5
KPMBL-D	2	1	2	0,75
KPMBL-D	0,75	0,5	2	0,5
KPMBL-D	1,5	1	2	1
ECMBL-A	1	1	12	4
ECMBL-A	1,5	2	6	6
ECMBL-B	0,5	0,5	0,75	1
ECOMBL-A	1	0,19	0,094	0,094
ECOMBL-B	0,38	0,125	0,38	0,25
CFMBL-A	1	0,38	0,25	0,19

Abreviaturas: KPMBL-A, clon A de *K. pneumoniae*; KPMBL-B, clon B de *K. pneumoniae*; KPMBL-C, clon C de *K. pneumoniae*; KPMBL-D, clon D de *K. pneumoniae*; ECMBL-A, clon A de *E. cloacae*; ECMBL-B, clon B de *E. cloacae*; ECOMBL-A, clon A de *E. coli*; ECOMBL-B, clon B de *E. coli*; CFMBL-A, clon A de *C. freundii*.

Por otro lado, aunque el aztreonam no es hidrolizado por las carbapenemasas de tipo MBL, dos aislados de *K. pneumoniae* y dos de *E. cloacae* (recogidos durante el primer período) mostraron resistencia a este antibiótico. Este hecho podría ser debido a la producción de SHV-12 e hiperproducción de AmpC, respectivamente, que presentaban estos aislados. El perfil de sensibilidad a los antibióticos no betalactámicos fue variable entre las diferentes cepas (tabla 17).

1.3 Estructura poblacional

El análisis de la estructura poblacional mediante PFGE de los aislados de *K. pneumoniae* (n=8) productores de VIM-1 mostró la presencia de 4 patrones de PFGE o pulsotipos. Con el posterior análisis mediante MLST se observó que la mayoría de estos pulsotipos pertenecían al complejo clonal (CC)23 que incluyó la ST163 y su *single locus variant* (SLV) ST253 (<http://eburst.mlst.net/>) (figura 19). El clon KPMBL-A-ST39 (n=2) se aisló en 2006 de dos pacientes sin un aparente nexo epidemiológico. Posteriormente el clon KPMBL-C-ST253 se detectó en 2009 en un paciente hospitalizado en Neurología, mientras que el clon KPMBL-D-ST163 (n=4) fue aislado en 2010 de dos pacientes extrahospitalarios y uno hospitalizado en Medicina Interna. La nueva secuencia tipo ST688 se correspondió con el clon KPMBL-B, aislado de un solo paciente en 2009 (tabla 17).

Los aislados de *E. coli* se agruparon en STs (ST2441 y ST155) pertenecientes al CC155, normalmente asociado a infecciones del tracto urinario. El aislado de *E. cloacae* detectado en el segundo período no tuvo ninguna relación clonal con los aislados del brote ocurrido en nuestro hospital en 2005 (tabla 17). Cabe destacar que durante el segundo período de estudio se detectó por primera vez un aislado de *C. freundii* productor de carbapenemasa en nuestra institución.

1.4 Entorno genético del gen *bla*_{VIM-1} y caracterización de los plásmidos.

Los genes *bla*_{VIM-1} se localizaron en integrones de clase 1, In110 e In113, previamente identificados en nuestro hospital durante el brote y designados arbitrariamente como tipos A y B ^{162,205} (figura 20). El integrón In110 (tipo A) [*bla*_{VIM-1}-*aacA4-aadA1*, ca. 2.5kb] se identificó en dos de los tres aislados de *E. cloacae* y en un aislado de *K. pneumoniae*. El integrón In113 (tipo B) [*bla*_{VIM-1}-*aacA4-dhfrII* (también denominado *dfrB1*)-*aadA1-catB2*, 4 kb] fue identificado en todos los aislados de *K. pneumoniae* con la excepción de uno, en un aislado de *E. cloacae*, en los dos aislados de *E. coli* y en el aislado de *C. freundii*. Al igual que se había observado con anterioridad, In110 se detectó en plásmidos de 300 Kb del tipo IncHI2 mientras que In113 estuvo presente en plásmidos con tamaños comprendidos entre 30 y 50 Kb del tipo IncN.

2. *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de VIM-1 en el Hospital Ramón y Cajal (período 2008-2013)

En este apartado se analizan los resultados obtenidos del estudio de enterobacterias productoras de MBL tanto en muestras clínicas como de vigilancia epidemiológica, recibidas en el Servicio de Microbiología del hospital Ramón y Cajal desde abril de 2008 hasta diciembre de 2013.

Figura 19. eBurst de *K. pneumoniae*. Se destaca el CC23 donde están incluidas la mayoría de las STs encontradas en nuestro trabajo.

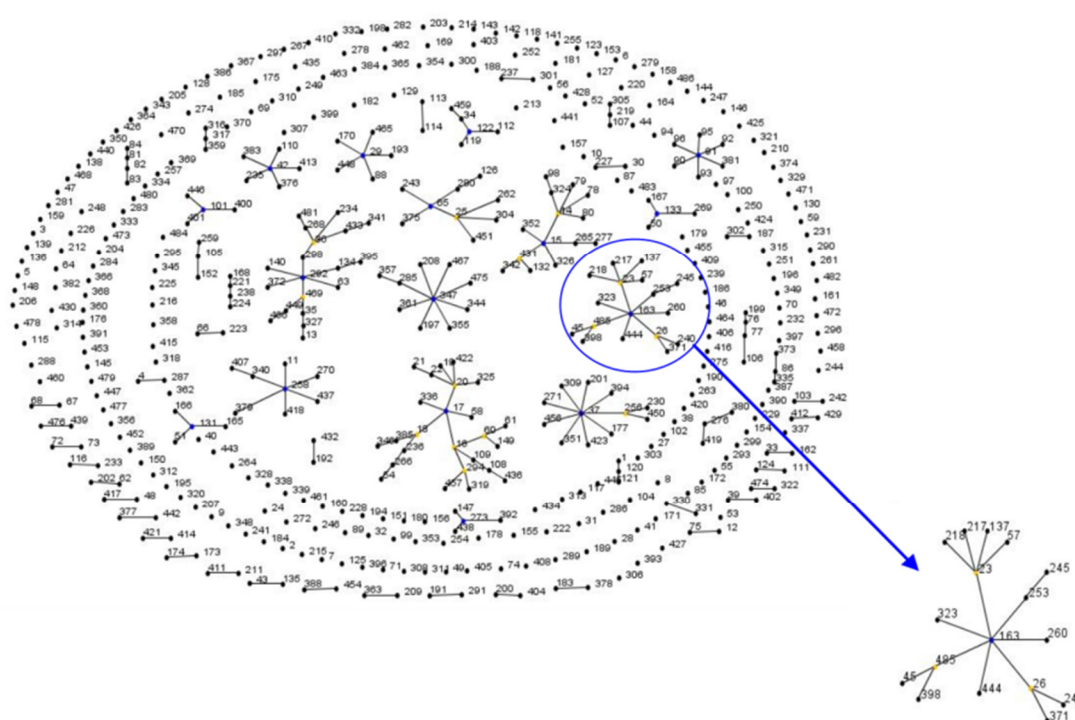
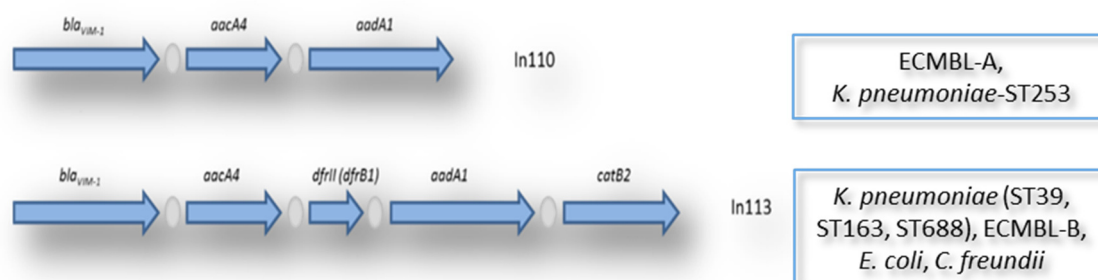


Figura 20. Integrones de clase 1 portadores del gen *bla_{VIM-1}*



2.1 Características de los pacientes

Durante período de estudio se identificaron un total de 92 pacientes con aislamientos de *K. pneumoniae* (n=70 aislados) y *E. coli* (n=27 aislados) productores de MBL en muestras clínicas (64,1%, 59/92) y de vigilancia epidemiológica (36%, 33/92). La media de edad de los pacientes durante el período de estudio fue de 67,1 años (rango de edad de 5 meses a 99 años) y más de la mitad de los pacientes (52,2%, n=48/92) fueron hombres. En 68 pacientes se aisló *K. pneumoniae* (49 infectados y 19 colonizados), en 3 de ellos se detectó posteriormente colonización por *E. coli*, y en 22 pacientes se aisló *E. coli* (10 infectados y 13 colonizados), en uno

de ellos detectamos más tarde colonización por *K. pneumoniae*. En un paciente se detectó de forma simultánea ambos microorganismos (colonización), mientras que 4 pacientes presentaron infección y posterior colonización por ambos microorganismos. Cabe destacar que, en este grupo de pacientes, en las muestras de vigilancia epidemiológica, se aisló un microorganismo productor de MBL distinto al causante de la infección.

El 44,6% de los pacientes (41/92) infectados/colonizados por enterobacterias productoras de MBL estaban ingresados en áreas médicas, 32,6% (30/92) en áreas quirúrgicas, 14,1% (13/92) en UCI y 8,7% (8/92) de los pacientes eran extrahospitalarios (figuras 21 y 22).

Figura 21. Número de pacientes infectados o colonizados por enterobacterias productoras de VIM por áreas de hospitalización.

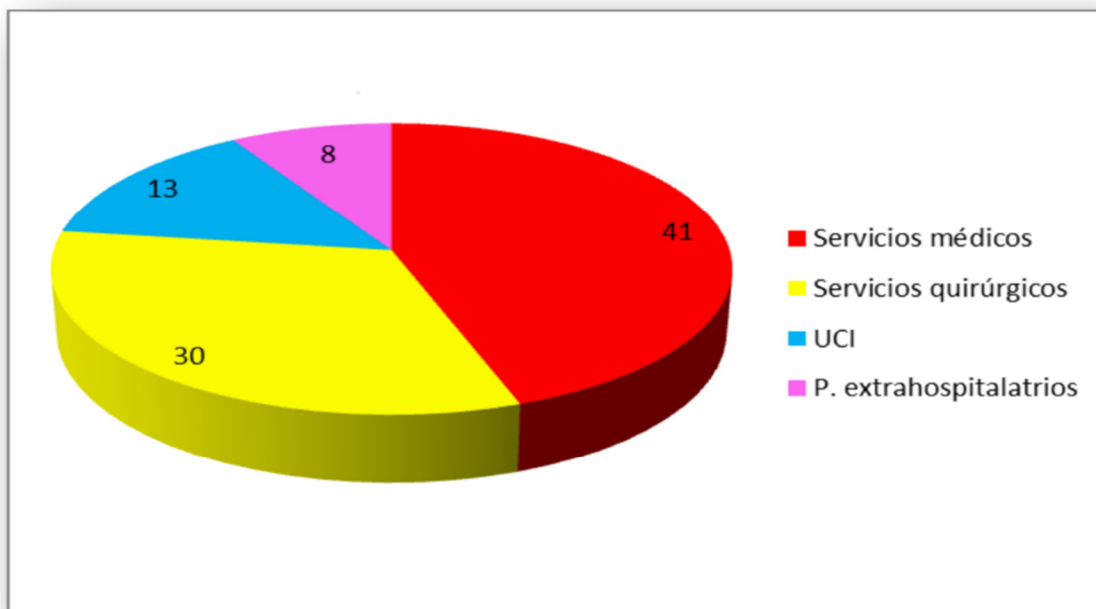
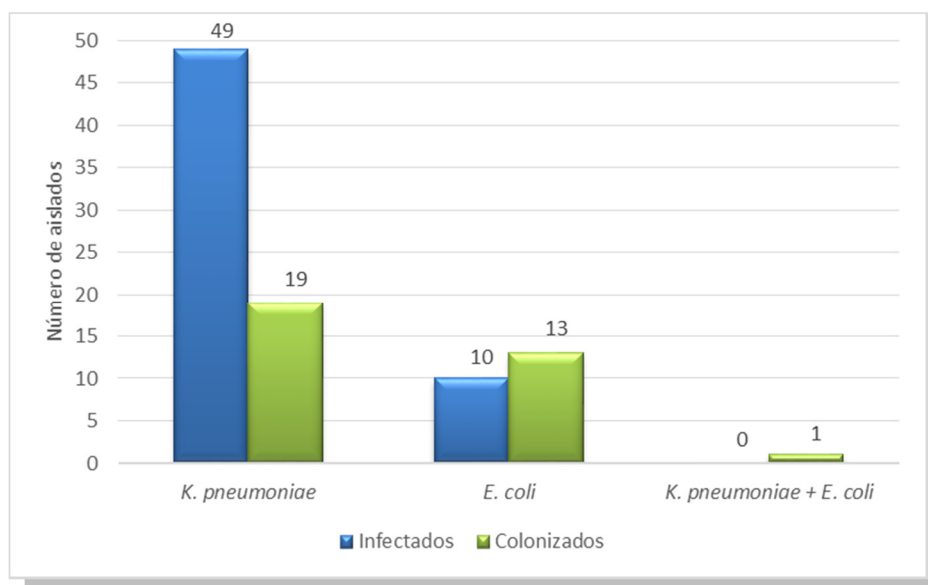


Figura 22. Número de pacientes infectados/colonizados con enterobacterias productoras de VIM-1.



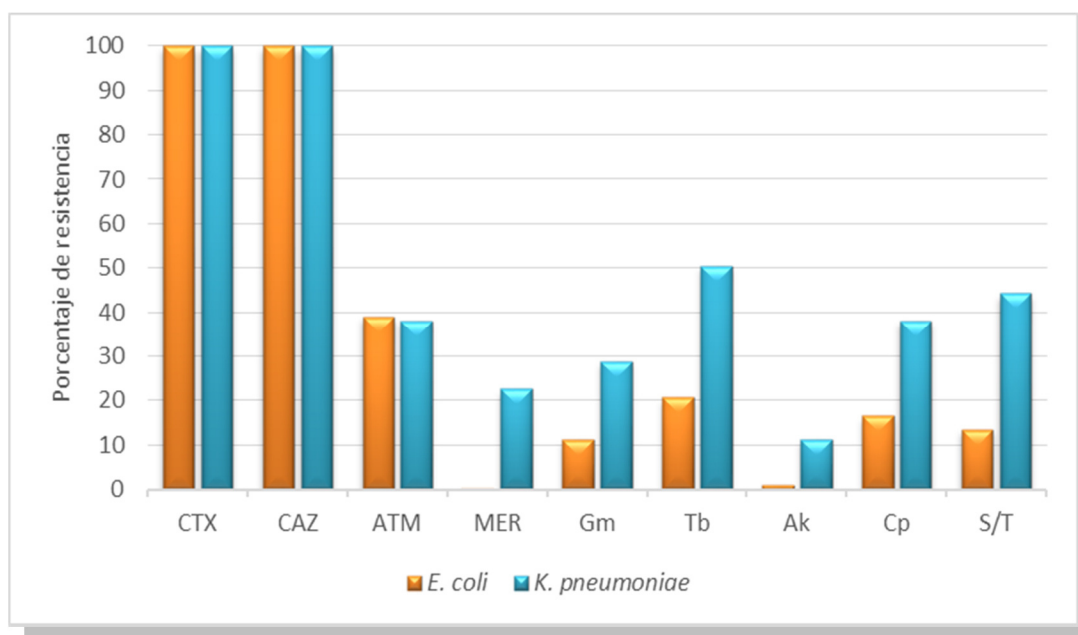
2.2 Caracterización de carbapenemasas

Los 97 aislados mostraron resultado positivo en el THM y el test CarbaNP. El estudio de doble difusión con discos de carbapenems y EDTA nos mostró la posible presencia de carbapenemasas del tipo MBL que posteriormente se identificaron como VIM-1 mediante PCR. Además, 10 aislados (6 *K. pneumoniae* y 4 *E. coli*) también producían enzimas del tipo CTX-M (1 CTX-M-3, 1 CTX-M-14, 7 CTX-M-15 y 1 CTX-M-32), 12 aislados de *K. pneumoniae* producían enzimas del tipo SHV (2 SHV-11, 9 SHV-12 y 1 SHV-36), un aislado de *K. pneumoniae* producía CTX-M-15 y TEM-1 además de VIM-1 y un aislado de *E. coli* producía también CTX-M-32 y TEM-1. Cabe destacar que en 2012 comenzó en nuestro hospital un brote por enterobacterias productoras de OXA-48; durante este período se encontraron 7 aislados co-productores de OXA-48 y VIM-1 (4 *K. pneumoniae* y 3 *E. coli*). En la tabla 19 se muestran los datos epidemiológicos y microbiológicos de los aislados productores de VIM-1.

2.3 Perfil de sensibilidad

Todos los aislados productores de VIM-1 (n=97) fueron resistentes a las combinaciones de penicilinas-inhibidores de betalactamasa y a las cefalosporinas de amplio espectro. A pesar de esto, 43,3% (42/97) y 10,3% (10/97) de los aislados fueron sensibles a imipenem y ertapenem, respectivamente. Aunque aztreonam no se hidroliza por las carbapenemasas del tipo MBL, el 46% (36/78) de los aislados fueron resistentes a este antibiótico, 8 de los cuales producían también enzimas del tipo CTX-M y 6 producían enzimas del tipo SHV. En 21/97 aislados no se estudió este antibiótico debido al diseño de los paneles de sensibilidad empleados. Respecto a los aminoglucósidos, 40,2% (39/97) de los aislados se mostraron resistentes a gentamicina, 71,13% (69/97) a tobramicina y 12,4% (12/97) a amikacina. En la figura 23 se encuentra representado el porcentaje de resistencia por especie.

Figura 23. Porcentaje de resistencia en *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de VIM-1.



Abreviaturas: CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; MER, meropenem; Gm, gentamicina; Tb, tobramicina; Ak, amikacina; Cp, ciprofloxacino; S/T, trimetoprim-sulfametoxazol.

Nota: la resistencia a aztreonam solo fue testada en el 46% de los aislados.

Tabla 19. Datos epidemiológicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de VIM-1.

Especie	Pulstotipo (nº de aislados)	Secuencia tipo	Tamaño plásmido (kb)	RFLP	Rep	Rel	Corresistencias	Servicio	Otras β-lactamasas	
<i>K. pneumoniae</i> (n=70)	E (n=5)	ST1	280	A	NT	L/M	Gm, Tb, Na, Cp, S/T (n=3), Fm (n=2)	Gastroenterología (n=3) CGD (n=2)	-	
	L (n=2)	ST1	60, 80	N	NT	L/M	Gm, Tb, Na, Cp, S/T	CGD (n=2)	-	
	NT (n=1)	ST1	50	A	NT	L/M	Gm, Tb, Na, Cp, Fm	Gastroenterología	-	
	P (n=3)	ST11	No híbrida	NT	NT	L/M	Na, Cp, S/T, Fm (n=1)	UCI Neurocirugía (n=2) Gastroenterología (n=1)	CTX-M-15 (n=3)	
	AE (n=1)	ST11	50	H	NT	L/M	Gm, Tb, Na, Cp, S/T	Urología	SHV-12	
	N (n=7)	ST15	50	A	NT	N, L/M	Gm, Tb, Ak (n=2), Na, Cp, S/T, Fm (n=3)	Neurocirugía(n=4) UCI Neurocirugía (n=2) Geriatría (n=1)	-	
	AB (n=1)	ST15	No híbrida	G	N	N	Gm, Tb, Na, Cp, S/T	Ambulatorio	-	
	D (n=1)	ST17	50	A	HI2	HI2	-	Neumología	-	
	K (n=1)	ST34	65	NT	NT	NT	S/T	Reumatología	-	
	AH (n=1)	ST34	60	I	NT	L/M	Tb, S/T	Neurología	-	
	Q (n=1)	ST35	No híbrida	NT	NT		Gm, Tb, NF, Na, Cp, S/T	UCI Médica	-	
	A (n=5)	ST39	130 (n=1)	A	NT	L/M	Gm, Tb, Na, Cp, S/T, Fm	Hematología	E. Infecciosas (n=1) Reumatología (n=1)	-
			60 (n=2)	A	NT	L/M	Tb, Ak, Na (n=1), Mn, S/T, Fm	CGD (n=2)		
			50 (n=2)	A	NT	L/M	Gm (n=1), Tb, Ak, Na, Cp (n=1), Mn, S/T Fm (n=1)			
	R (n=3)	ST39	50	A	NT	L/M	Gm (n=1), Tb, Ak, NF (n=1), Na, Cp, Mn (n=1), S/T, Fm (n=2)	Ambulatorios (n=2) Cardiología (n=1)	-	
	NT (n=2)	ST39	60	A	NT	L/M	Gm (n=1), Tb, Ak, NF (n=1), Na, Mn (n=1), S/T, Fm	UCI Cardiovascular (n=1) Pediatría (n=1)	-	
	O (n=1)	ST45	No híbrida	NT	NT	L/M	Gm, Tb, S/T	Oncología	-	
	B (n=9)	ST54	60 (n=3)	M	NT	NT	NF (n=1), Na (n=7), Cp (n=1), S/T (n=8), Fm (n=3)	Hematología (n=1) Urología (n=1)	SHV-12 (n=6)	
			65 (n=3)	M	NT	NT		Traumatología (n=1)		
			70 (n=1)	M	NT	NT		Cirugía Cardíaca (n=1)		
			75 (n=1)	M	NT	NT		CGD (n=1)		
			270 (n=1)	M	NT	Flik		Nefrología (n=1)		
								Medicina Interna (n=1) Ambulatorios (n=2)		

Tabla 19. Datos epidemiológicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de VIM-1 (continuación).

Especie	Pulstotipo (nº de aislados)	Secuencia tipo	Tamaño plásmido (kb)	RFLP	Rep	Rel	Corresistencias	Servicio	Otras β-lactamasas
<i>K. pneumoniae</i> (n=70)	T (n=3)	ST54	No híbrida	E	NT	NT	S/T (n=2), Fm (n=1)	Urología (n=2) Ambulatorio (n=1)	-
	M (n=2)	ST144	60	A	NT	L/M	Na (n=1), Cp (n=1)	Cirugía Cardíaca (n=1) UCI Médica (n=1)	-
	X (n=1)	ST144	50	J	NT	L/M	Tb, Na, Cp, S/T, Fm	Ambulatorio	-
	H (n=1)	ST147	50	K	N		NF, Na, Cp, S/T	Ambulatorio	-
	U (n=1)	ST147	No híbrida	E	NT	N	Tb, NF, Na, Cp, S/T, Fm	Cirugía Cardíaca	CTX-M-3
	C (n=3)	ST253	50	A	NT	HI2, L/M	S/T (n=1), Fm (n=1)	Neurología (n=2) UCI Médica (n=1)	
	AF (n=1)	ST253	No híbrida	NT	NT	NT	Tb	Cirugía Maxilofacial	SHV-36
	W (n=1)	ST322	50	NT	NT	N	Tb, Na, Cp, S/T	Nefrología	SHV-12
	AD (n=1)	ST340	No híbrida	NT	N	N	Tb, NF, Na, Cp, S/T	Ambulatorio	-
	F (n=1)	ST384	No híbrida	NT	NT	Flik	-	Cirugía Vascular	-
	NT (n=1)	ST463	50	A	NT	L/M	Gm, Tb, Ak, S/T, Fm	Ambulatorio	-
	G (n=1)	ST502	70	A	NT	L/M	S/T	Nefrología	-
	Y (n=1)	ST751	No híbrida	A	NT	L/M	Gm, Tb, NF, Na, Cp, S/T	Ambulatorio	-
	V (n=1)	ST839	No híbrida	A	NT	L/M	Gm, Tb, NF, Na, S/T, Fm	Nefrología	SHV-12
	AG (n=1)	ST976	60	I	NT	L/M	Tb, Na, S/T	Ambulatorio	-
	NT (n=1)	ST1427	No híbrida	NT	NT	Flik	Gm, Tb, Na, Cp, S/T	CGD	CTX-M-15
	AC (n=1)	ST1603	No híbrida	NT	NT	HI2	S/T	UCI Médica	SHV-11
	NT (n=1)	ST1603	No híbrida	NT	NT	HI2	Gm, Tb, Na, Cp, S/T	UCI Médica	SHV-11
	I (n=1)	ST1681	50	NT	N	N	Na, S/T	Ambulatorio	-
	S (n=1)	ST1866	55	L	NT	N	Na, S/T	Ambulatorio	-
	AA (n=1)	ST2389	No híbrida	A	NT	L/M	S/T	Medicina Interna	-

Tabla 19. Datos epidemiológicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de VIM-1 (continuación).

Especie	Pulstipo (nº de aislados)	Secuencia tipo	Tamaño plásmido (kb)	RFLP	Rep	Rel	Corresistencias	Servicio	Otras β-lactamasas
<i>E. coli</i> (n=27)	D (n=1)	ST10	No híbrida	A	NT	L/M	Gm, Tb	UCI	CTX-M-32
	R (n=1)	ST29	80	A	NT	L/M	Tb, S/T	Nefrología	-
	K (n=1)	ST58	60	NT	NT	L/M	Na, S/T, FM	Traumatología	-
	H (n=2)	ST73	60	A	NT	L/M	Na (n=1), Cp (n=1), S/T (n=2)	Gastroenterología (n=1) CGD (n=1)	-
	E (n=1)	ST88	No híbrida	NT	NT	NT	Gm, Tb, Na, Cp, S/T	Ambulatorio	CTX-M-14
	V (n=1)	ST93	50	NR	NT	L/M	Na, Cp	Medicina Interna	-
	B (n=1)	ST131	100	NT	NT	L/M	Tb, Ak, Na, Cp, S/T	Medicina Interna	CTX-M-15
	S (n=1)	ST131	100	NT	NT	NT	Gm, Tb, Na, Cp	Medicina Interna	CTX-M-15
	W (n=1)	ST155	50	F	NT	L/M	Cp, S/T	Traumatología	-
	Q (n=1)	ST354	50	A	NT	L/M	Gm, Tb, Na, Cp, S/T	Cirugía Cardíaca	-
	U (n=1)	ST354	50	A	NT	L/M	Gm, Tb, Na, Cp, S/T	Nefrología	-
	M (n=1)	ST357	290	NT	NT	HI2	Gm, Tb, S/T	E. Infecciosas	-
	X (n=1)	ST361	50	NT	NT	L/M	Gm, Tb, Na, Cp, S/T	Oncología	-
	L (n=1)	ST453	60	NT	NT	L/M	Gm, Tb, Na, Cp	Gastroenterología	-
	Y (n=1)	ST453	No híbrida	NT	NT	L/M	Na, Cp	Ambulatorio	-
	O (n=1)	ST542	50	A	NT	L/M	Gm, Tb, Mn, S/T	CGD	-
	Z (n=1)	ST544	145	C	NT	NT	Gm, Tb, Na, S/T	Ambulatorio	-
	J (n=1)	ST676	60	NT	NT	L/M	S/T	Medicina Interna	-
	G (n=1)	ST906	60	B	NT	L/M	Tb, Na, Cp, S/T	Reumatología	-
	F (n=1)	ST1434	60	NT	NT	L/M	-	Traumatología	-
	C (n=1)	ST1571	60	NT	NT	L/M	Tb	Medicina Interna	-
	I (n=1)	ST2003	60	A	NT	L/M	Gm, Tb, Na, Cp, Mn, S/T	Neurocirugía	-
	A (n=1)	ST2697	235	NT	NT	N	Tb, Nf, Na, Cp, S/T	Hematología	-
	P (n=1)	ST3024	50	A	NT	L/M	Na, Cp, S/T	CGD	-
	NT (n=1)	ST4300	60	D	NT	NT	Gm, Tb, Na, Cp, Mn, S/T	Gastroenterología	-
	T (n=1)	ST4302	50	A	NT	L/M	Gm, Tb, S/T	Oncología	-

Abreviaturas: RFLP, fragmentos de restricción de longitud polimórfica; Rep, replicasas (grupos Inc), Rel, relaxasas (grupos Inc), Rel, no tipable; NR, no realizado; CGD, Cirugía General y Digestivo; UCI, unidad de Cuidados Intensivos; Gm, gentamicina; Tb, tobramicina, Ak, amikacina; Nf, nitrofurantoina; Na, ácido nalidixico; Cp, ciprofloxacino; Mn, minociclina; S/T, sulfametoxazol-trimetoprim; Fm, fosfomicina

2.4 Estructura poblacional

En este estudio se observó una diversidad clonal relativamente alta en los aislados de *K. pneumoniae* (70 aislados se correspondieron con 32 pulsotipos). En el estudio mediante MLST los aislados se agruparon en 22 STs, siendo la ST54 (12/70), ST39 (10/70) y ST15 (7/70) las que se identificaron con mayor frecuencia (tabla 19). Respecto a los aislados que co-producían VIM-1 y OXA-48, el estudio mediante MLST mostró que estos aislados pertenecían a la ST11 (3/4) y ST405 (1/4) (tabla 20). En la figura 24-i) se representa la secuencia temporal de las STs de los aislados de *K. pneumoniae*, en la que se observa una gran variabilidad clonal. No obstante, a pesar de esta variabilidad ciertos clones persisten a lo largo del período de estudio. Al principio del período de estudio predominó el clon Kp-A-ST39 (2008). En junio y noviembre de 2009 emergen los clones Kp-M-ST54 y Kp-A-ST15 y persisten hasta el final del período de estudio. El clon de alto riesgo ST11 aparece en este estudio en febrero de 2011 y se encuentra de manera puntual hasta el final del período de estudio.

Los aislados de *E. coli* productores de VIM-1 presentaron una mayor diversidad clonal que los aislados de *K. pneumoniae*; 27 aislados se correspondieron con 25 pulsotipos, los cuales se agruparon en 23 STs según los estudios de MLST. Cabe destacar que en dos pacientes se identificó el clon de alto riesgo ST131; en un paciente se aisló de un hemocultivo y el otro paciente estaba colonizado (tabla 19). Respecto a los aislados productores de VIM-1 y OXA-48, el estudio mediante MLST reveló que pertenecían a la ST1406 (2/3) y ST3163 (1/3) (tabla 20). En la figura 24-ii) se representa la secuencia temporal de las ST de los aislados de *E. coli*, en la que se observa una alta diversidad poblacional, sin aparente persistencia clonal. Cabe destacar la presencia del clon de alto riesgo ST131 que aparece de manera esporádica en noviembre de 2008 y en diciembre de 2011.

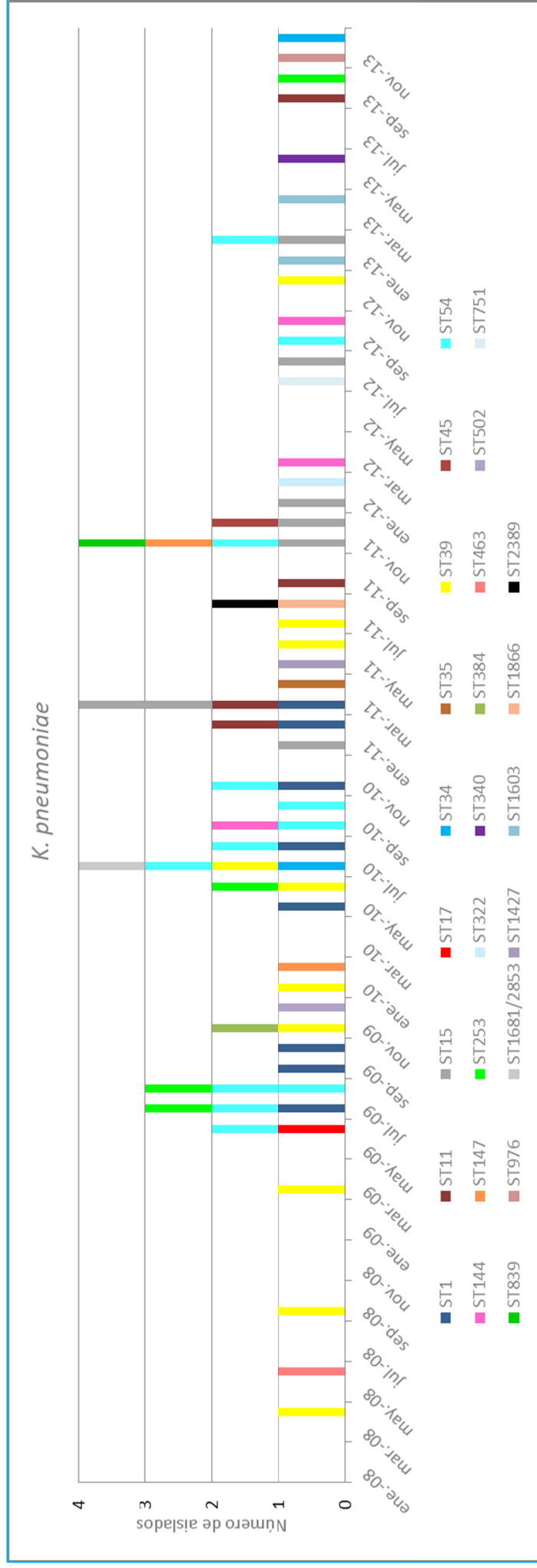
2.5 Análisis de los plásmidos portadores de *bla*_{VIM-1}

El gen *bla*_{VIM-1} se transfirió en 28 aislados (29%, 28/97) y se localizó en plásmidos con tamaños comprendidos entre 50 y 90 Kb pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncN (n=12), IncHI2 (n=5) e IncL/M (n=29). Sin embargo, en 3 aislados de *E. coli* el gen *bla*_{VIM-1} se encontraba en plásmidos de mayor tamaño (145, 235 y 290 Kb) que pertenecían a los grupos de incompatibilidad IncL/M, IncN e IncHI2, respectivamente. También se encontraron plásmidos con el gen *bla*_{VIM-1} de 130, 270 y 280 Kb en aislados de *K. pneumoniae*, los cuales se correspondieron con los grupos de incompatibilidad IncL/M (los plásmidos de 130 y 280 Kb) e IncFIK (el plásmido de 270 Kb) (tabla 19).

Para el análisis de RFLP se seleccionó una cepa por pulsotipo y ST (n=49). Se identificaron 14 patrones de RFLP diferentes, de los cuales el mayoritario fue el patrón denominado A (n=44 aislados) (44/49 aislados; uno de ellos no se realizó), el cual se relacionó en la mayoría de los aislados con el grupo de incompatibilidad IncL/M (69,4%, 34/49). En el resto de los aislados este patrón A estuvo asociado con IncN (4/49), con IncHI2 (3/49). En tres aislados no se consiguió tipar los aislados.

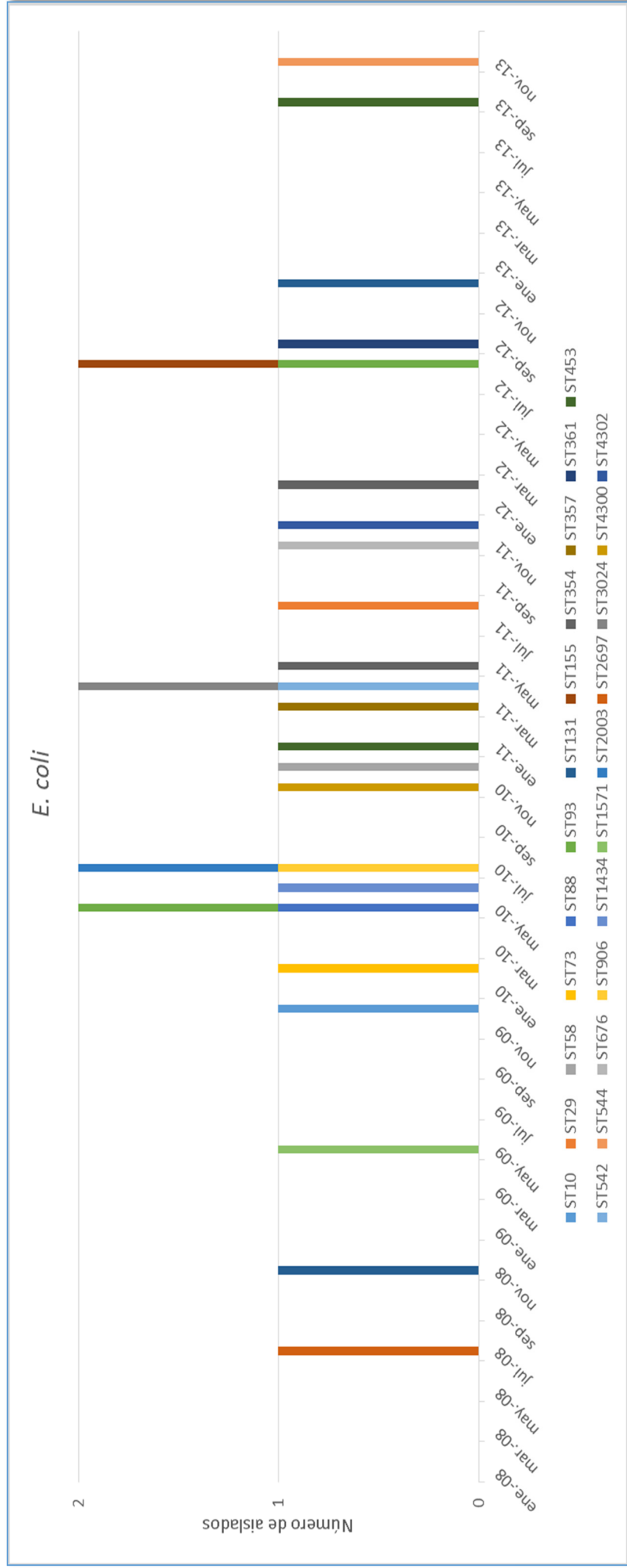
Figura 24. Secuencia temporal de las STs de *K. pneumoniae* (i) y *E. coli* (ii) productores de VIM-1.

i)



Durante los primeros meses del estudio se observa predominio de la ST39, a partir de julio de 2009 comienza a aparecer la ST54 y a partir de noviembre del mismo año aparece la ST15, que se mantiene hasta casi el final del período de estudio.

ii)



Observamos que no hay predominio de ningún clon. Al principio del período de estudio aparece el clon de alto riesgo ST131 y no vuelve a ser detectado hasta casi el final del período de estudio.

3. Estudio de aislados clínicos productores de OXA-48

3.1 Características de los pacientes

En 2012 se detectó por primera vez en nuestra institución enzimas de tipo OXA-48. El primer paciente en el que se encontró estaba ingresado en el Servicio de Urología y de un urocultivo se aisló *Klebsiella aerogenes* productora de OXA-48 y CTX-M-15. Al mes siguiente, este mismo paciente presentó un hemocultivo positivo para *K. pneumoniae* productora de OXA-48 y se detectó también este aislado en muestras de control epidemiológico. En este Servicio comenzó la dispersión de los aislados productores de OXA-48 y fue aquí donde la mayoría de los aislados de *K. pneumoniae* pertenecieron al mismo clon (KP-A), el cual se correspondió con la ST11. Durante los primeros 4 meses, los pacientes con infección o colonización por enterobacterias productoras de OXA-48 se localizaron en el Servicio de Urología (figura 25) y posteriormente, comenzaron a detectarse en otras áreas del hospital.

Durante el período de estudio (marzo de 2012-diciembre 2013) se detectaron un total de 58 pacientes infectados o colonizados por enterobacterias productoras de OXA-48. La mayoría de los pacientes identificados (43 hombres y 26 mujeres) tenían edades superiores a 65 años siendo la media de edad de 69 años (rango de edad de 18 a 92 años). Los pacientes estaban ingresados en áreas médicas (n=20, 35%), áreas quirúrgicas (n=21, 36%) y en UCI (n=4, 7%) (Figura 25). Hay que destacar que 13 aislados pertenecían a 13 pacientes del ámbito extrahospitalario en el momento de la recogida de muestra. No obstante, 9 de estos pacientes habían estado previamente ingresados en nuestro hospital (tabla 20).

Tabla 20. Datos epidemiológicos de los aislados clínicos productores de OXA-48

Especies (nº de aislados)	Pulstipo (nº de aislados)	Secuencia tipo	Tamaño plás- mido (kb)	RFLP	Rep	Rel	Corresistencias	Servicio	Otras β-lactamasas
<i>K. pneumoniae</i> (n=60)	A (n=40)	ST11	50 (n=38) 220 (n=29)	A NR	Flik (n=38)	L/M (n=17)	Gm, Tb, Cp, Na, S/T, Fm, NF	Urología (n=8) CGD (n=5) Neurología (n=2) Cirugía vascular (n=1) Medicina preventiva (n=5) Medicina interna (n=3) Hematología (n=2) Cardiología (n=1) Gastroenterología (n=1) Nefrología (n=1) Neurología (n=1) UCI (n=2) Extrahospitalarios (n=6)	CTX-M-15 (n=38) VIM-1 (n=3)
	D (n=2)	ST11	50 (n=1) 60 (n=1)	A NR	-	L/M (n=1)	Tb, Cp (n=2) Gm (n=1) Fm (n=1)	Extrahospitalarios (n=2)	CTX-M-15 (n=2)
	I (n=1)	ST11	65	A	Flik	L/M	Gm, Tb, Cp, S/T	Hematología	CTX-M-15
	K (n=1)	ST11	60	A	-	-	Gm, Tb, Cp, S/T	CGD	CTX-M-15
	M (n=1)	ST11	65	A	-	-	Tb, Na, Cp, S/T, Fm	Extrahospitalario	CTX-M-15
	F (n=1)	ST15	40	B	-	L/M	Cp, Fm (n=1)	Neumología	-
	H (n=1)	ST15	50	B	-	-	Gm, Cp, S/T (n=1)	Extrahospitalario	-
	O (n=1)	ST307	60	-	-	-	Gm, Tb, Cp, S/T	Otorrinolaringología	CTX-M-15
	P (n=1)	ST307	60		Flik	-	Gm, Tb, Cp, S/T	Neurocirugía	CTX-M-15
	B (n=4)	ST405	50 (n=2) 60 (n=1) 70 (n=1)	C (n=3)	Flik (n=4)	L/M (n=4)	Gm, Tb, Cp, S/T (n=4) Fm (n=1)	Cirugía vascular (n=2) UCI CGD (n=1) Extrahospitalario (n=1)	CTX-M-15 (n=3)
	E (n=2)	ST405	60 (n=1) 40 (n=1)	NR	Flik (n=1)	L/M (n=1)	Gm, Tb, Cp (n=1)	Geriatría (n=1)	CTX-M-15 (n=1)
	J (n=1)	ST405	60	C	Flik	L/M	Gm, Tb, Cp, S/T	Urología	CTX-M-15, VIM-1
	C (n=1)	ST487	50	-	-	L/M	-	Traumatología	-
	G (n=1)	ST712	60	A	-	L/M	-	Medicina interna	CTX-M-15
	N (n=1)	ST971	50	A	Flik	-	-	Oncología	-
	L (n=1)	ST1427	-	-	Flik	-	Gm, Tb, Cp, S/T, Fm	Extrahospitalario	-

Tabla 20. Datos epidemiológicos de aislados clínicos productores de OXA-48 (continuación).

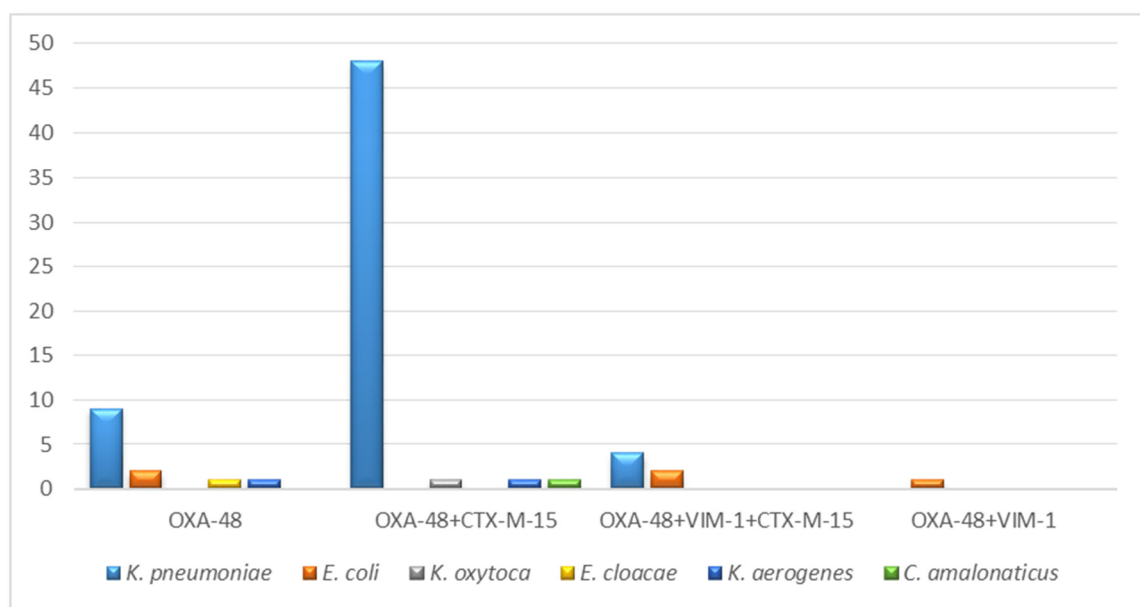
Especies (nº de aislados)	Pulsotipo (nº de aislados)	Secuencia tipo	Tamaño plásmido (kb)	RFLP	Rep	Rel	Corresistencias	Servicio	Otras β-lactamasas
<i>E. coli</i> (n=5)	C (n=1)	ST540	50	D	Flik	L/M	S/T	Extrahospitalario	-
	B (n=2)	ST1406	60 (n=2)	A	Flik (n=1)	L/M (n=2)	Gm, Tb (n=1) S/T (n=2)	CGD (n=2)	CTX-M-15 (n=1) VIM-1 (n=2)
				NR					
	A (n=1)	ST3163	50	NR	-	-	Gm, Tb, Cp, S/T	Urología	CTX-M-15, VIM-1
	D (n=1)	ST4301	50	A	Flik	L/M	Cp, S/T	Oncología	
<i>K. aerogenes</i> (n=2)	-	-	50	NR	Flik (n=2)	L/M (n=2)	Gm, Tb, Cp, S/T (n=1) -	Urología (n=1) UCI CGD (n=1)	CTX-M-15 (n=1)
<i>E. cloacae</i> (n=1)	-	-	50	A	Flik	L/M	Gm, Tb, Cp, S/T	Traumatología	-
<i>K. oxytoca</i> (n=1)	-	-	50	-	Flik	L/M	-	Oncología	CTX-M-15
<i>C. amalonaticus</i> (n=1)	-	-	50	A	-	L/M	-	Enfermedades infecciosas	CTX-M-15

Abreviaturas: RFLP, fragmentos de restricción de longitud polimórfica; Rep, replicasas (grupos Inc), Rel, relaxasas (grupos Inc), Rel, relaxasas (grupos Inc), ST, secuencia tipo; NT, no tipable; NR, no realizado; CGD, Cirugía General y Digestivo; UCI, unidad de Cuidados Intensivos; Gm, gentamicina; Tb, tobramicina; Ak, amikacina; Nf, nitrofurantoina; Na, ácido nalidixico; Cp, ciprofloxacino; Mn, minociclina; S/T, sulfametoxazol-trimetoprim; Fm, fosfomicin

3.2 Caracterización de OXA-48

Durante el período estudiado se recogieron 71 aislados en los 58 pacientes colonizados o infectados por enterobacterias productoras de OXA-48 (61 *K. pneumoniae*, 5 *E. coli*, 1 *K. oxytoca*, 2 *K. aerogenes*, 1 *E. cloacae* y 1 *Citrobacter amalonaticus*). Además de OXA-48, 51 aislados (72%) (48 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 1 *K. aerogenes* y 1 *C. amalonaticus*) producían también CTX-M-15, 6 aislados (8,4%) (4 *K. pneumoniae* y 2 *E. coli*) producían VIM-1 y CTX-M-15 junto con OXA-48 y un aislado (1,4%) (*E. coli*) también producía VIM-1 (figura 26).

Figura 26. Aislados con OXA-48 que producen otra carbapenemasa o una BLEE.



3.3 Perfil de sensibilidad

Todos los aislados productores de OXA-48 mostraron resistencia a las combinaciones de penicilina-inhibidores de betalactamasas, un 86% a las cefalosporinas de tercera generación y un 84,5% a las de cuarta generación. Basándonos en los resultados de CMI obtenidos con el sistema MicroScan, algunos aislados fueron sensibles a imipenem (57%, 41/72) y ertapenem (3%, 2/71). El perfil de resistencia a los antibióticos no betalactámicos se muestra en la tabla 20, con respecto a los aminoglucósidos, de los 71 aislados, el 74,6% (53/71) mostraron resistencia a gentamicina, el 80,2% (57/71) a tobramicina y el 2,8% (2/71) a amikacina. En el grupo de las quinolonas detectamos un 87,3% (62/71) de aislados resistentes a ciprofloxacino y finalmente, el 85,9% (61/71) de los aislados mostraron resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol.

3.4 Estructura poblacional

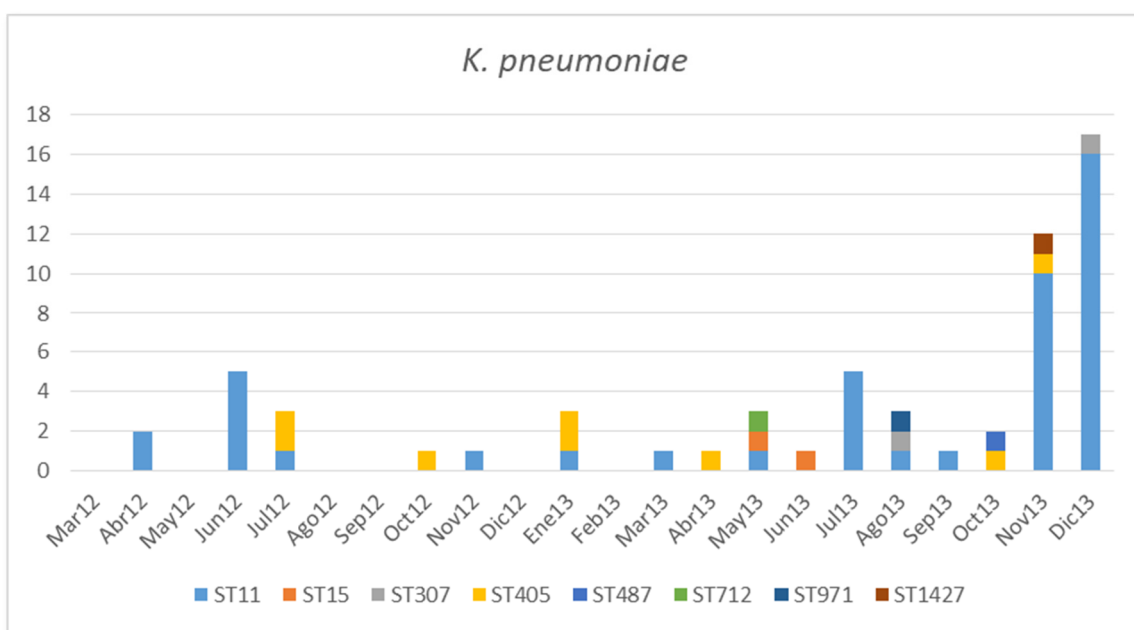
El estudio de tipificación mediante PFGE agrupó los aislados de *K. pneumoniae* productores de OXA-48 en 16 pulsotipos (de KP-A a KP-P), los cuales se relacionaron posteriormente con las siguientes secuencias tipo: ST11, ST15, ST307, ST405, ST487, ST712 y ST971 (tabla 20). Las STs encontradas con mayor frecuencia fueron ST11 (n=45) y ST405 (n=6). La figura 27 (i) muestra la tendencia temporal de los clones a lo largo del período de estudio. Durante los primeros 4 meses, y coincidiendo con la emergencia de estos aislados en el Servicio de Urología, predominó la ST11 observándose rápidamente una mayor diversidad poblacional como consecuencia de la aparición de otros clones. No obstante, al final del período de estudio se observa una mayor diseminación de ST11. Por otro lado, los aislados de *K. pneumoniae* que producían VIM-1 y CTX-M-15 pertenecieron a estos clones de alto riesgo (ST11 y ST405) (tabla 20).

Respecto a los aislados de *E. coli* productores de OXA-48, el estudio de PFGE identificó 4 pulsotipos que correspondían a las secuencias tipo ST540, ST1406, ST4301 y a la nueva ST3163. Los aislados que además producían VIM-1 pertenecían a la secuencia tipo ST1406 y ST3163. Con respecto a la distribución temporal de los ST de *E. coli*, la figura 27 (ii) nos muestra que el primer aislado apareció a los cuatro meses tras la emergencia del primer caso. Ya no se detectaron más aislados de *E. coli* hasta el final del período estudiado.

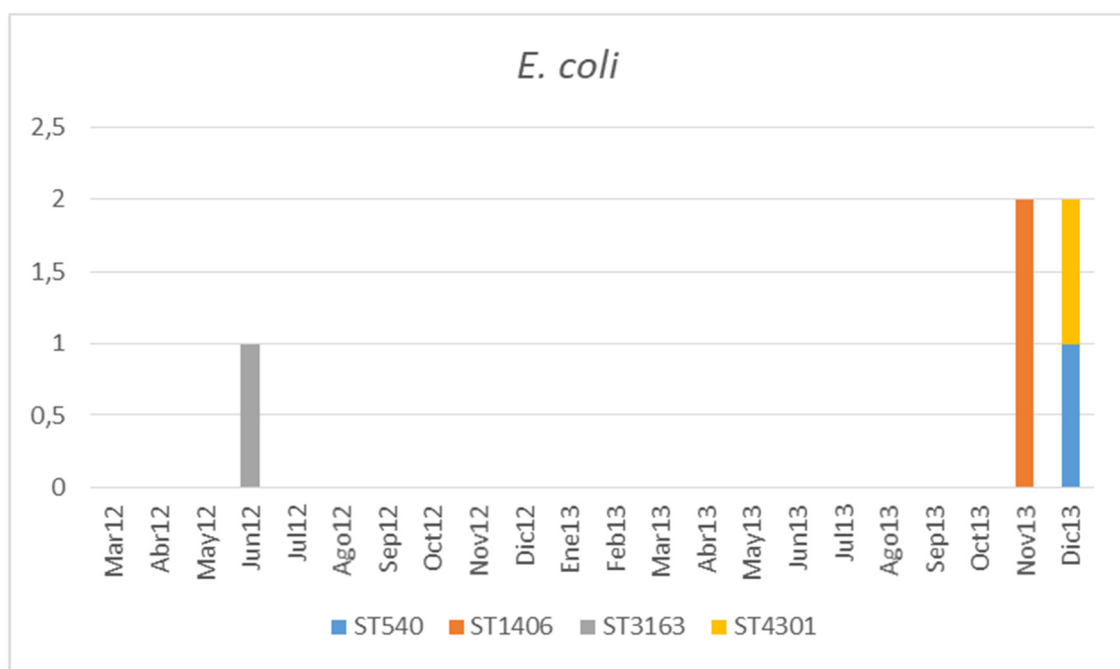
En la figura 28 se representa la asociación entre las secuencias tipo más frecuentes generadas del análisis mediante MLST. Esta asociación se realizó con la plataforma Phyloviz (<http://www.phyloviz.net/>) que permite el análisis de estos métodos de tipificación utilizando el algoritmo goeBURST. Observamos que los clones de alto riesgo, como son ST11 y ST405 y en menor medida ST15 y ST307 son los clones más diseminados por todas las áreas del hospital. Además, estos clones presentan en su mayoría *bla*_{CTX-M}, con la excepción de ST15.

Figura 27. Secuencia temporal de las ST de *K. pneumoniae* (i) y *E. coli* (ii) productores de OXA-48.

i)



ii).



3.5 Localización del gen *bla*_{carbapenemasa} y tipado del plásmido

Los genes *bla*_{OXA-48} se localizaron en plásmidos de 50 Kb y transfirieron por conjugación en 59 de los 71 aislados estudiados (52 *K. pneumoniae*, 3 *E. coli*, 2 *K. aerogenes*, 1 *K. oxytoca* y 1 *C. amalonaticus*). Mediante hibridación *Southern blot* se comprobó que estos plásmidos contenían otros mecanismos de resistencia como *bla*_{VIM-1} y *bla*_{CTX-M-15} (figura 29). La mayoría de los plásmidos que contenían OXA-48 no fueron tipables mediante el protocolo descrito por Villa y cols.²¹⁹. Además, 31 de 71 aislados presentaron plásmidos tipo L/M según los genes codificantes para relaxasas²¹⁸.

Para el análisis mediante RFLP de los plásmidos portadores de OXA-48 se seleccionaron 28 (21 *K. pneumoniae*, 3 *E. coli*, 1 *K. aerogenes*, 1 *K. oxytoca*, 1 *E. cloacae* y 1 *C. amalonaticus*) aislados como representantes de cada uno de los pulsotipos y STs identificados. La mayoría de estos aislados (26/28) presentaron un perfil de bandas similar (figura 30). Posteriormente se comprobó que estos plásmidos tenían un esqueleto similar mediante la amplificación de los genes *repA*, *traU* y *parA*. Estos amplicones se secuenciaron y se comprobó que eran idénticos a los plásmidos pOXA-48 descritos con anterioridad por Poirel y cols.²³⁴.

Figura 28. Análisis de las secuencias tipo mediante la plataforma Phyloviz. **A/** Relación entre las STs de *K. pneumoniae* y las áreas de hospitalización de los pacientes. **B/** Relación entre las STs de *K. pneumoniae* y la producción de VIM-1. **C/** Relación entre las STs de *K. pneumoniae* y la producción de CTX-M-15. **D/** Relación entre las STs de *E. coli* y las áreas de hospitalización de los pacientes. **E/** Relación entre las STs de *E. coli* y la producción de VIM-1. **F/** Relación entre las STs de *E. coli* y la producción de CTX-M-15.

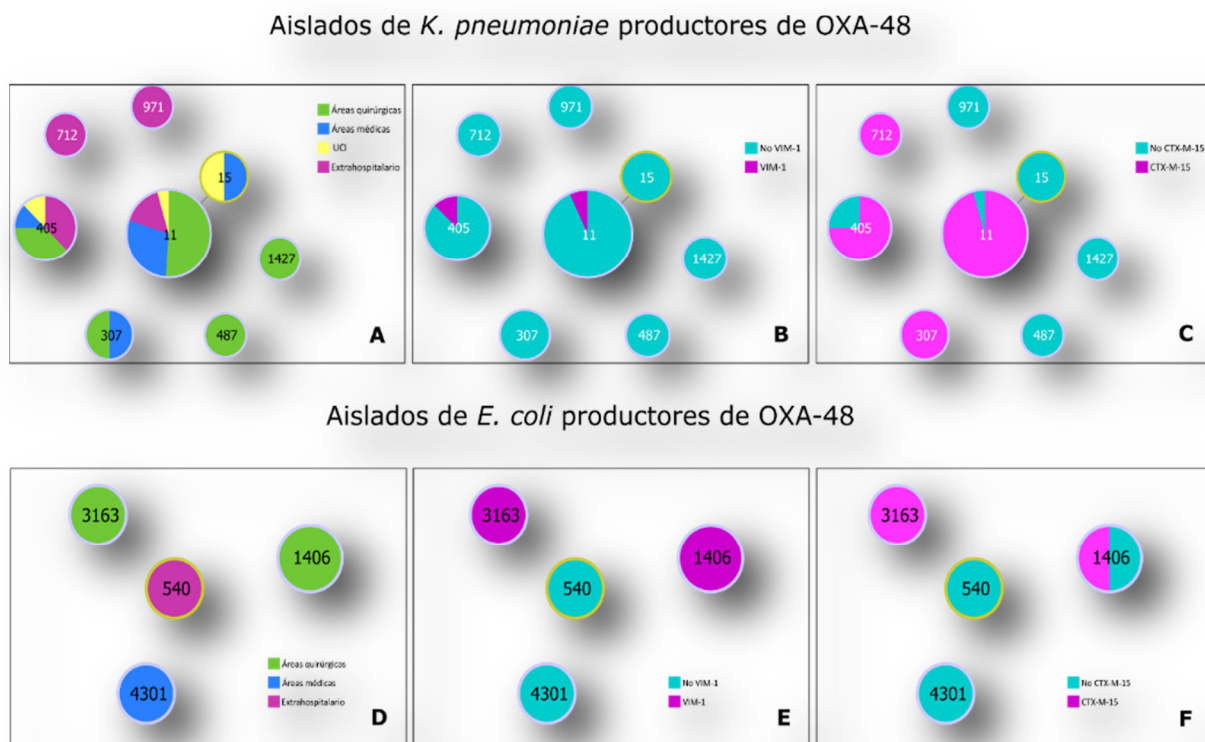
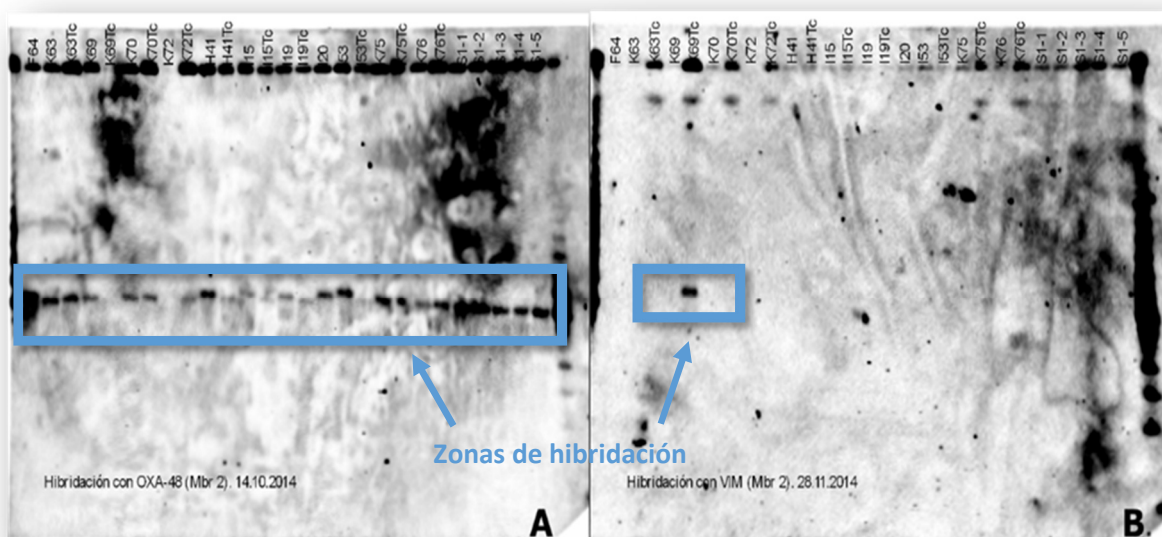


Figura 29. Hibridación *Southern blot* en aislados productores de OXA-48. **A/** La sonda utilizada fue OXA-48. **B/** La sonda utilizada fue VIM-1.

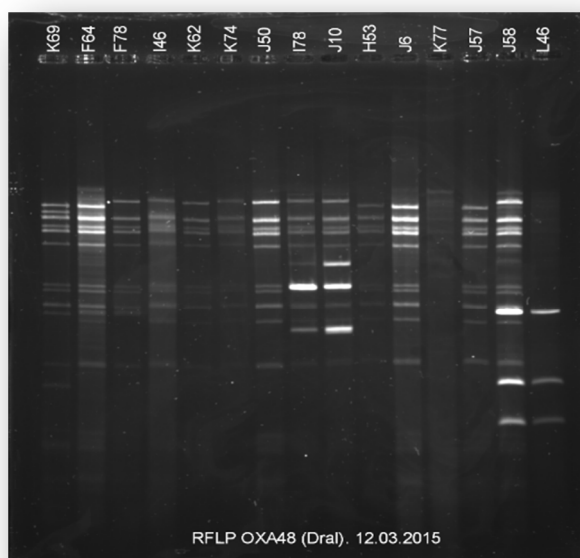


3.6 Secuenciación del plásmido pRYC-OXA-48

Para la secuenciación del plásmido pRYCOXA-48 se seleccionó una cepa representativa del clon epidémico ST11. Esta cepa se secuenció de forma completa analizándose a partir de ella la secuencia plasmídica que contenía *bla*_{OXA-48}.

Los resultados de la secuenciación pusieron de manifiesto que el plásmido pRYCOXA-48 tiene un tamaño de 74,686 bp con 92 secuencias codificantes (CDS) y un contenido en G+C de 50,8%. El gen OXA-48 se encuentra localizado en el transposón Tn1999.2, el cual se inserta en el gen *tir*, tal y como se ha descrito con anterioridad ²³⁵. Además de llevar el gen *bla*_{OXA-48}, este plásmido porta también el gen que codifica para CTX-M-15 asociado con *ISEcp1* que se inserta cerca del transposón Tn1999.2 pero no dentro del transposón que lleva el gen *bla*_{OXA-48}. En este plásmido no se encontraron otros mecanismos de resistencia (figura 31). La comparación de nuestro plásmido mediante MAUVE y BRIG con otros plásmidos portadores del gen *bla*_{OXA-48} nos indicó una estructura muy similar de dichos plásmidos, los cuales comparten la misma estructura esqueleto de plásmido portador de OXA-48 tipo IncL (figura 32).

Figura 30. RFLP de aislados productores de OXA-48.



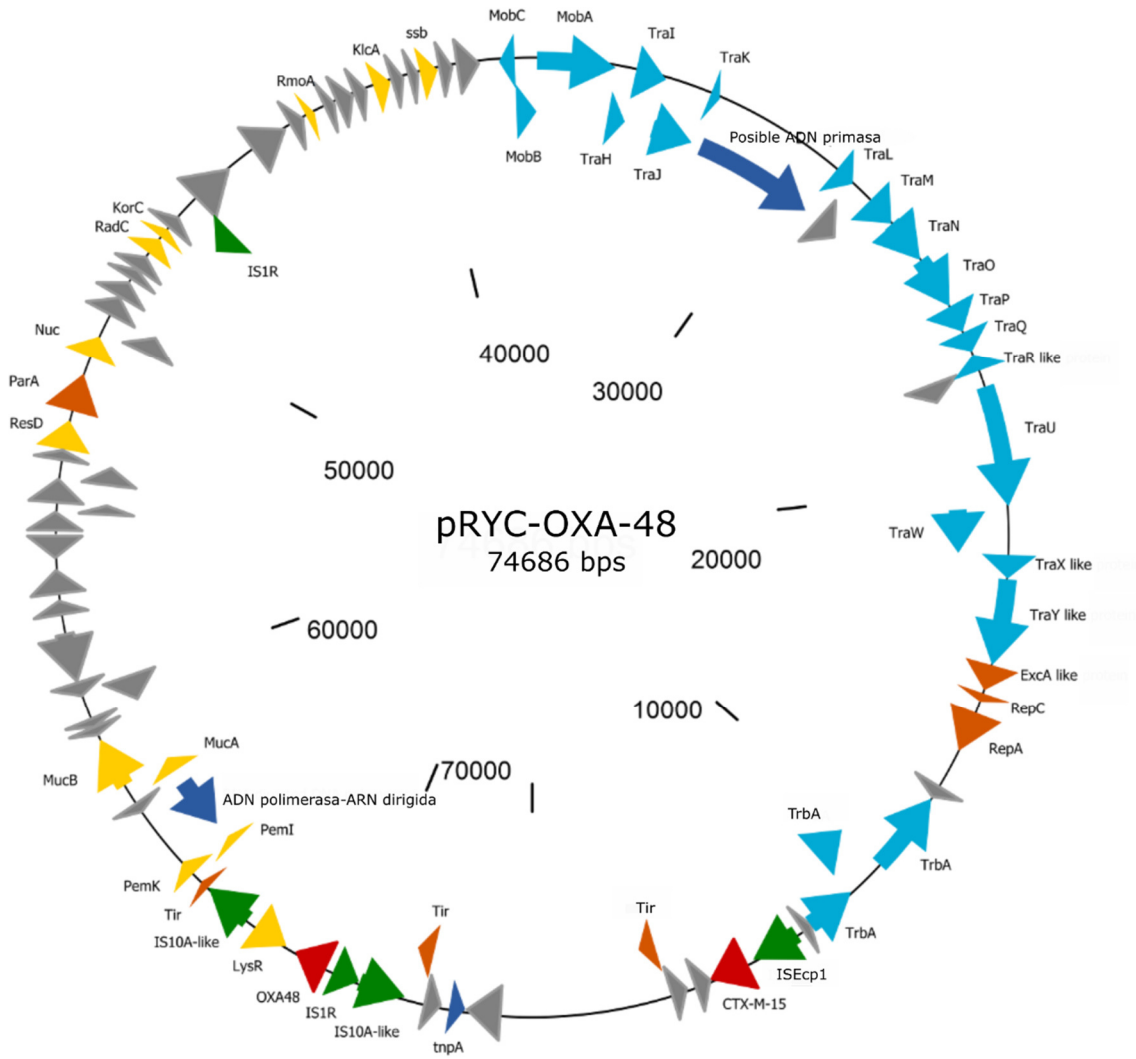
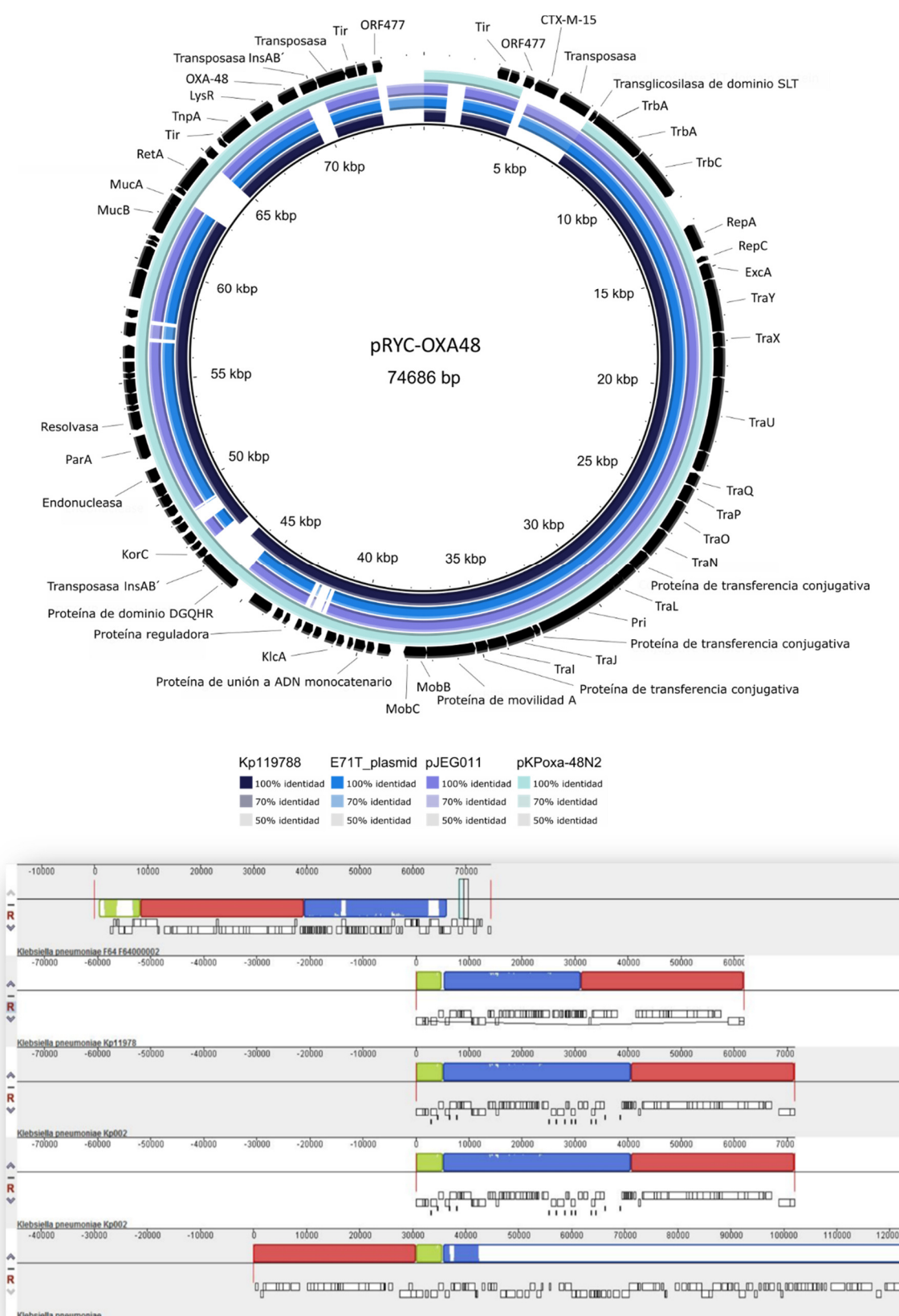


Figura 32. Comparación, mediante MAUVE (A) y BRIG (B), del plásmido pRYC-OXA-48 con otros plásmidos portadores del gen *bla*_{OXA-48}.



Nota: Los nº de acceso en GenBank para Kp119788, E71T_plasmid, pJEG011 y pKPoxa-48N2 son JN626286.1, KC335143.1, KC354801.1 y NC021502.1, respectivamente.

4. Estudio de sensibilidad mediante microcalorimetría isotérmica y ensayo de sinergia

En todos los ensayos realizados, la producción de calor por el metabolismo bacteriano de los aislados estudiados fue suficiente para generar una señal detectable mediante el sistema CalScreener® (Symcel Sverige AB, Spånga, Suecia) a lo largo del tiempo, siendo independiente del fenotipo de resistencia.

4.1 Validación del sistema CalScreener®: Comparación de los valores de CMI obtenidos mediante microdilución en caldo y microcalorimetría isotérmica

Para la validación del sistema CalScreener® se definieron los valores diagnósticos para los valores de CMI obtenida mediante CalScreener® en comparación con los obtenidos mediante microdilución en caldo. Considerando todos los aislados en su conjunto (n=46, 6 cepas de referencia y 40 aislados clínicos), el acuerdo categórico del método calorimétrico para PTZ, CTX, MER, AK y CP fue del 100%, 97,8%, 97,8%, 97,8% y 100%, respectivamente. Obtuvimos un acuerdo esencial del 100% para todos los antibióticos estudiados. Igualmente, los errores menores obtenidos fueron de 2,2% para todos los antibióticos excepto para ciprofloxacina que no tuvo errores menores. Asimismo, no se detectaron errores mayores ni graves (tabla 21).

Tabla 21. Valores diagnósticos (%) obtenidos tras la comparación de la microcalorimetría con la microdilución en caldo.

	Antimicrobiano				
	PTZ	CTX	MER	AK	CP
AC	100	97,8	97,8	97,8	100
AE	100	100	100	100	100
EMe	2,2	2,2	2,2	2,2	0
EM	0	0	0	0	0
EG	0	0	0	0	0

Abreviaturas: AC, acuerdo categórico; AE, acuerdo esencial; EMe, error menor; EM, error mayor; EG, error grave.

En la tabla 22 se muestran los valores de CMI de cada antimicrobiano obtenidos mediante microdilución en caldo y empleando CalScreener® de los aislados que no presentaron ningún mecanismo de resistencia (n=20). Sólo obtuvimos discrepancias en 4 de estos aislados. En la tabla 23 se muestran los valores de CMI de cada antimicrobiano obtenidos mediante microdilución en caldo y empleando CalScreener® de los aislados que presentaron algún mecanismo de resistencia (n=20). En este caso obtuvimos discrepancias en 8 de estos aislados. En ambos casos las discrepancias estuvieron dentro del rango ± 1 dilución (AE).

Tabla 22. Comparación de las CMIs obtenidas mediante microdilución en caldo y CalScreener® en los aislados que no presentaron ningún mecanismo de resistencia.

Aislados	PTZ		CTX		MER		AK		CP	
	MDC	MCI	MDC	MCI	MDC	MCI	MDC	MCI	MDC	MCI
<i>E. coli</i> 1	≤2	≤2	≤0,12	≤0,12	≤0,06	≤0,06	≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>E. coli</i> 2	4	≤2	≤0,12	≤0,12	≤0,06	≤0,06	8	8	>1	>1
<i>E. coli</i> 3	≤2	≤2	≤0,12	≤0,12	≤0,06	≤0,06	≤4	≤4	0.25	0.25
<i>E. coli</i> 4	≤2	≤2	≤0,12	≤0,12	≤0,06	≤0,06	≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>E. coli</i> 5	≤2	4	≤0,12	≤0,12	≤0,06	≤0,06	≤4	≤4	>1	>1
<i>E. coli</i> 6	≤2	≤2	≤0,12	≤0,12	≤0,06	≤0,06	≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>E. coli</i> 7	≤2	≤2	≤0,12	≤0,12	≤0,06	≤0,06	≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>E. coli</i> 8	≤2	≤2	≤0,12	≤0,12	≤0,06	≤0,06	≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>E. coli</i> 9	≤2	≤2	≤0,12	≤0,12	≤0,06	≤0,06	≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>E. coli</i> 10	≤2	≤2	≤0,12	≤0,12	≤0,06	≤0,06	≤4	≤4	≤0,03	≤0,03

Abreviaturas: PTZ, piperacilina-tazobactam; CTX, cefotaxima; MER, meropenem; AK, amikacina; CP, ciprofloxacino; MDC, microdilución en caldo; MCI, microcalorimetría isotérmica.
*En negrita se muestran las discrepancias en la CMI

Tabla 22. Comparación de las CMI's obtenidas mediante microdilución en caldo y CalScreener® en los aislados que no presentaron ningún mecanismo de resistencia (continuación).

Aislados	PTZ			CTX			MER			AK		CP	
	MDC	MCI		MDC	MCI		MDC	MCI		MDC	MCI	MDC	MCI
<i>K. pneumoniae</i> 1	≤2	≤2		≤0,12	≤0,12		≤0,06	≤0,06		≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>K. pneumoniae</i> 2	4	≤2		≤0,12	≤0,12		≤0,06	≤0,06		≤4	≤4	0,12	0,06
<i>K. pneumoniae</i> 3	≤2	≤2		≤0,12	≤0,12		≤0,06	≤0,06		≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>K. pneumoniae</i> 4	≤2	≤2		≤0,12	≤0,12		≤0,06	≤0,06		≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>K. pneumoniae</i> 5	≤2	≤2		≤0,12	≤0,12		≤0,06	≤0,06		≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>K. pneumoniae</i> 6	≤2	≤2		≤0,12	≤0,12		≤0,06	≤0,06		≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>K. pneumoniae</i> 7	16	32		≤0,12	≤0,12		≤0,06	≤0,06		≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>K. pneumoniae</i> 8	4	4		≤0,12	≤0,12		≤0,06	≤0,06		≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>K. pneumoniae</i> 9	4	4		≤0,12	≤0,12		≤0,06	≤0,06		≤4	≤4	≤0,03	≤0,03
<i>K. pneumoniae</i> 10	≤2	≤2		≤0,12	≤0,12		≤0,06	≤0,06		≤4	≤4	≤0,03	≤0,03

Abreviaturas: PTZ, piperacilina-tazobactam; CTX, cefotaxima; MER, meropenem; AK, amikacina; CP, ciprofloxacino; MDC, microdilución en caldo; MCI, microcalorimetría isotérmica.
 *En negrita se muestran las discrepancias en la CMI

Tabla 23. Comparación de las CMI's obtenidas mediante microdilución en caldo y CalScreener® en los aislados que presentaban algún mecanismo de resistencia.

Aislados	MR	PTZ		CTX		MER		AK		CP	
		MDC	MCI	MDC	MCI	MDC	MCI	MDC	MCI	MDC	MCI
<i>E. coli</i> 11	CTX-M-15	32	32	>4	>4	≤0,06	≤0,06	16	16	>1	>1
<i>E. coli</i> 12	CTX-M-15	8	8	>4	>4	≤0,06	≤0,06	16	16	>1	>1
<i>E. coli</i> 13	CTX-M-15	8	8	>4	>4	≤0,06	≤0,06	8	8	>1	>1
<i>E. coli</i> 14	CTX-M	≤2	≤2	>4	>4	≤0,06	≤0,06	≤4	≤4	>1	>1
<i>E. coli</i> 15	CTX-M-15; TEM-1	4	4	>4	>4	≤0,06	≤0,06	16	16	>1	>1
<i>E. coli</i> 16	IRT**	32	32	0,5	0,5	≤0,06	≤0,06	≤4	≤4	>1	>1
<i>E. coli</i> 17	CTX-M-15; OXA-48	>32	>32	>4	>4	1	0,5	8	8	>1	>1
<i>E. coli</i> 18	IRT**; TEM-1	32	>32	0.25	0.25	≤0,06	≤0,06	≤4	≤4	>1	>1
<i>E. coli</i> 19	OXA-48	>32	>32	4	2	2	1	≤4	≤4	>1	>1
<i>E. coli</i> 20	CTX-M	≤2	≤2	>4	>4	≤0,06	≤0,06	16	16	>1	>1

Abreviaturas: PTZ, piperacilina-tazobactam; CTX, cefotaxima; MER, meropenem; AK, amikacina; CP, ciprofloxacino; MR, mecanismo de resistencia; MDC, microdilución en caldo; MCI, microcalorimetría isotérmica.

*En negrita se muestran las discrepancias en la CMI

**Mecanismo de resistencia inferido

Tabla 23. Comparación de las CMIIs obtenidas mediante microdilución en caldo y CalScreener® en los aislados que presentaban algún mecanismo de resistencia (continuación).

Aislados	MR	PTZ			CTX			MER		AK		CP	
		MDC	MCI		MDC	MCI		MDC	MCI	MDC	MCI	MDC	MCI
<i>K. pneumoniae</i> 11	CTX-M-15; KPC-3	>32	>32		>4	>4		16	8	≤4	≤4	>1	>1
<i>K. pneumoniae</i> 12	AmpC plasmídica; pérdida de porinas**	>32	>32		4	4		2	1	>16	>16	>1	>1
<i>K. pneumoniae</i> 13	CTX-M-15	8	4		>4	>4		≤0,06	≤0,06	≤4	≤4	>1	>1
<i>K. pneumoniae</i> 14	AmpC plasmídica; pérdida de porinas**	>32	>32		>4	>4		2	2	>16	16	>1	>1
<i>K. pneumoniae</i> 15	CTX-M-15; OXA-48	>32	>32		>4	>4		0,5	0,5	≤4	≤4	>1	>1
<i>K. pneumoniae</i> 16	CTX-M-15	32	32		>4	>4		0.12	0.12	>16	>16	>1	>1
<i>K. pneumoniae</i> 17	CTX-M-15: KPC-3	>32	>32		>4	>4		8	8	16	16	>1	>1
<i>K. pneumoniae</i> 18	CTX-M-15; OXA-48	>32	>32		>4	>4		1	1	8	8	>1	>1
<i>K. pneumoniae</i> 19	CTX-M-15; KPC-3	>32	>32		>4	>4		16	16	16	16	>1	>1
<i>K. pneumoniae</i> 20	KPC-3	>32	>32		>4	>4		8	4	≤4	≤4	≤0.03	≤0.03

Abreviaturas: PTZ, piperacilina-tazobactam; CTX, cefotaxima; MER, meropenem; AK, amikacina; CP, ciprofloxacino; MR, mecanismo de resistencia; MDC, microdilución en caldo; MCI, microcalorimetría isotérmica.

*En negrita se muestran las discrepancias en la CMI

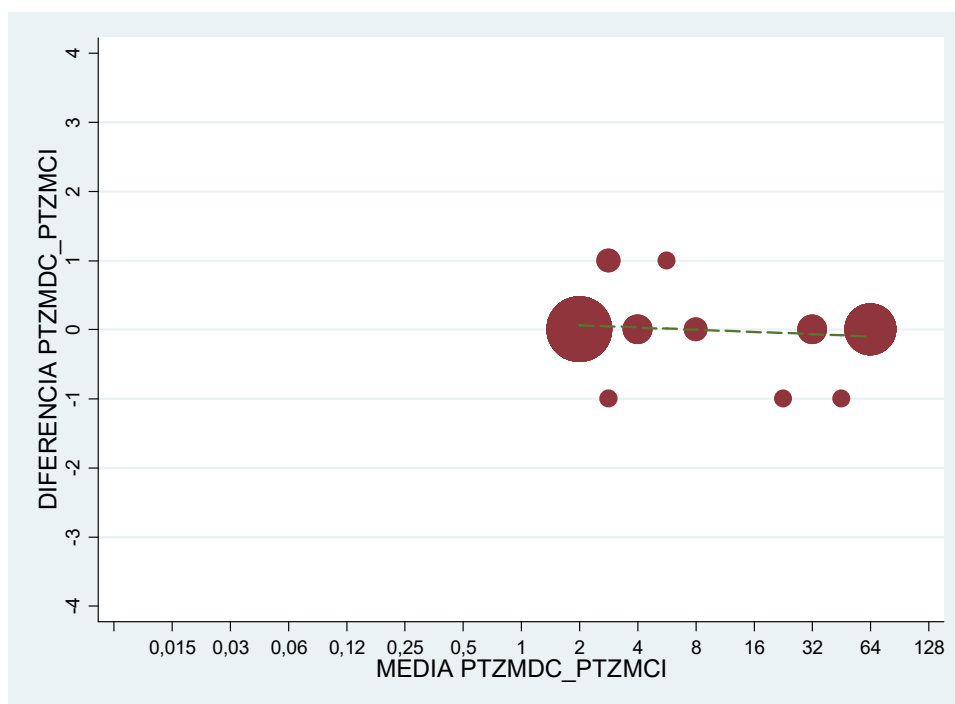
**Mecanismo de resistencia inferido

Para los aislados que no presentaron ningún mecanismo de resistencia se obtuvieron valores de AE del 100% para todos los antimicrobianos estudiados, los valores de AC fueron del 100% para todos a excepción de PTZ, para el que obtuvimos un AC del 95%. A modo de comparación, en aras de estudiar el comportamiento de la microcalorimetría en aislados con y sin mecanismos de resistencia también se calcularon los valores diagnósticos en los aislados que presentaron mecanismos de resistencia. En este caso los valores de AE fueron también del 100%, mientras que los valores de AC fueron del 95% para CTX, MER y AK y del 100% para PTZ y CP, no encontramos errores graves, mayores ni menores en este tipo de aislados.

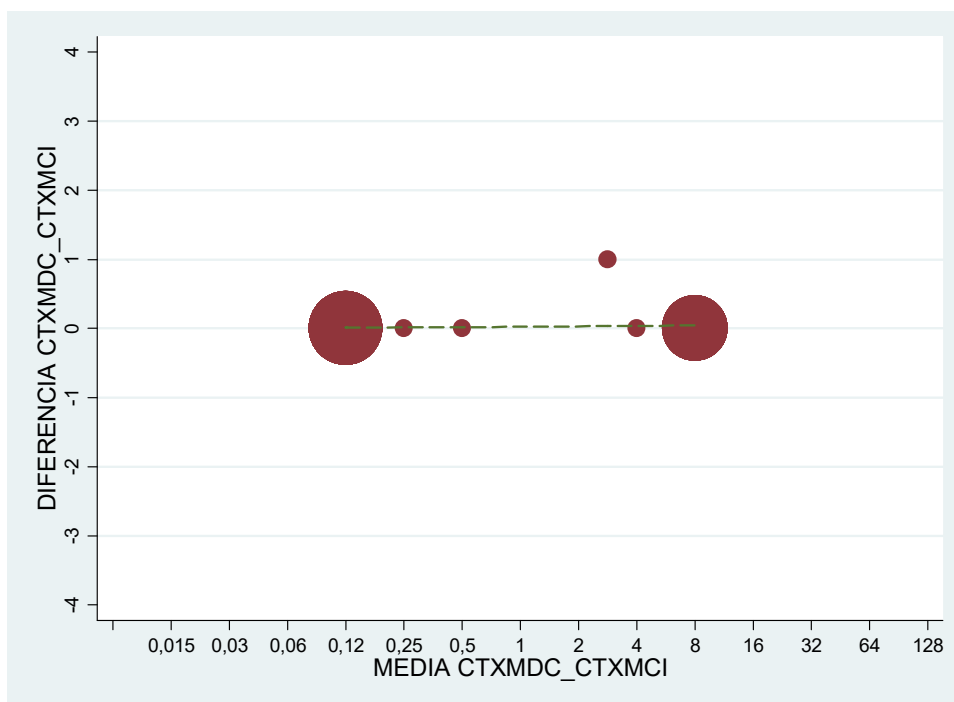
Utilizando el análisis de Bland-Altman (figura 33) en los 20 aislados que presentaron algún mecanismo de resistencia, se observó concordancia entre los dos métodos. Para todos los antimicrobianos estudiados se observa una buena concordancia ya que todos los puntos se encuentran distribuidos dentro del rango ± 1 CMI (EA). Para MER se observó que la calorimetría daba resultados de CMI ligeramente menores con respecto a la microdilución en los aislados con CMI más altas, pero siempre dentro del EA. En el caso de AK, la línea de tendencia es muy corta y se observan los puntos cercanos debido a que el número de concentraciones estudiadas fue bajo (4 mg/L, 8 mg/L y 16 mg/L).

Figura 33. Análisis de Bland-Altman: acuerdo observado representando la diferencia de valores de CMI frente a la media de los valores de CMI obtenidos con los métodos de microcalorimetría isotérmica y microdilución. La línea discontinua representa la tendencia de los puntos obtenidos.

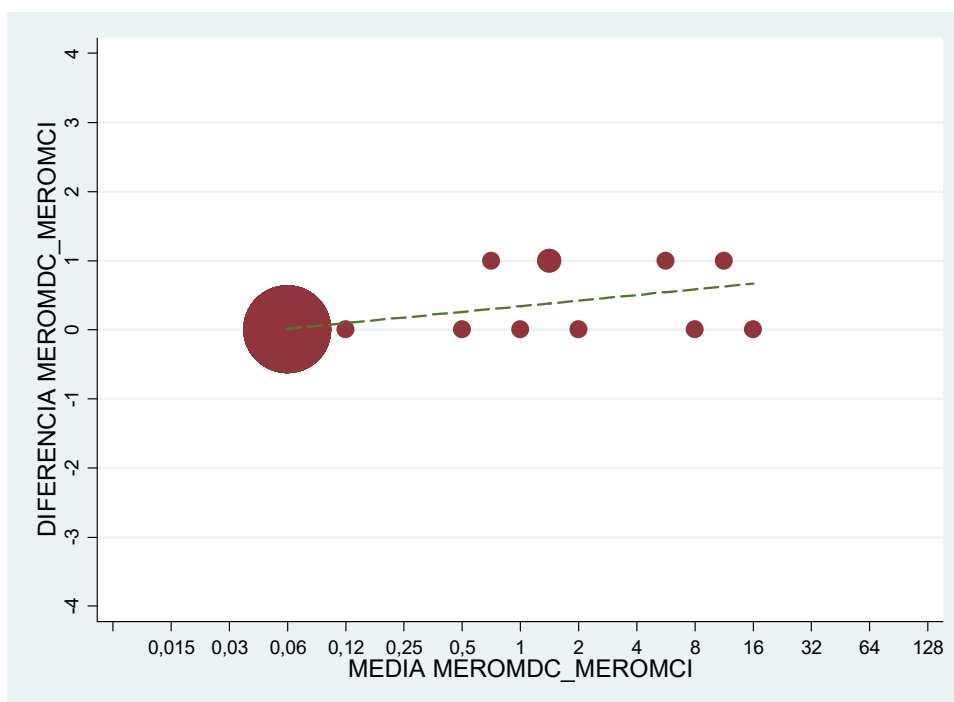
A) Análisis de Bland-Altman para PTZ.



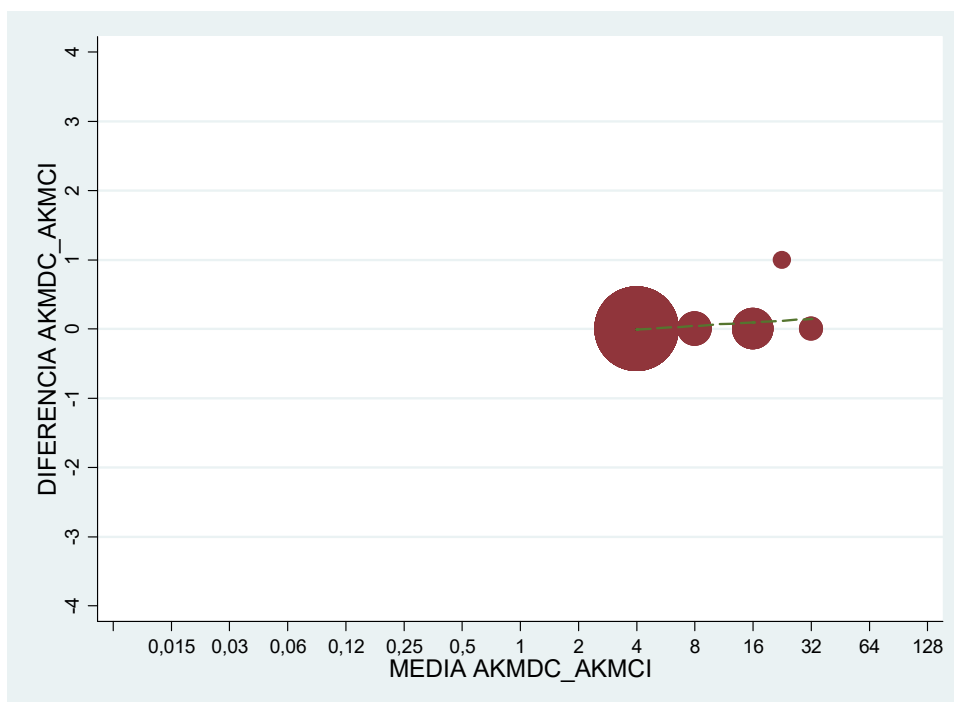
B) Análisis de Bland-Altman para CTX.



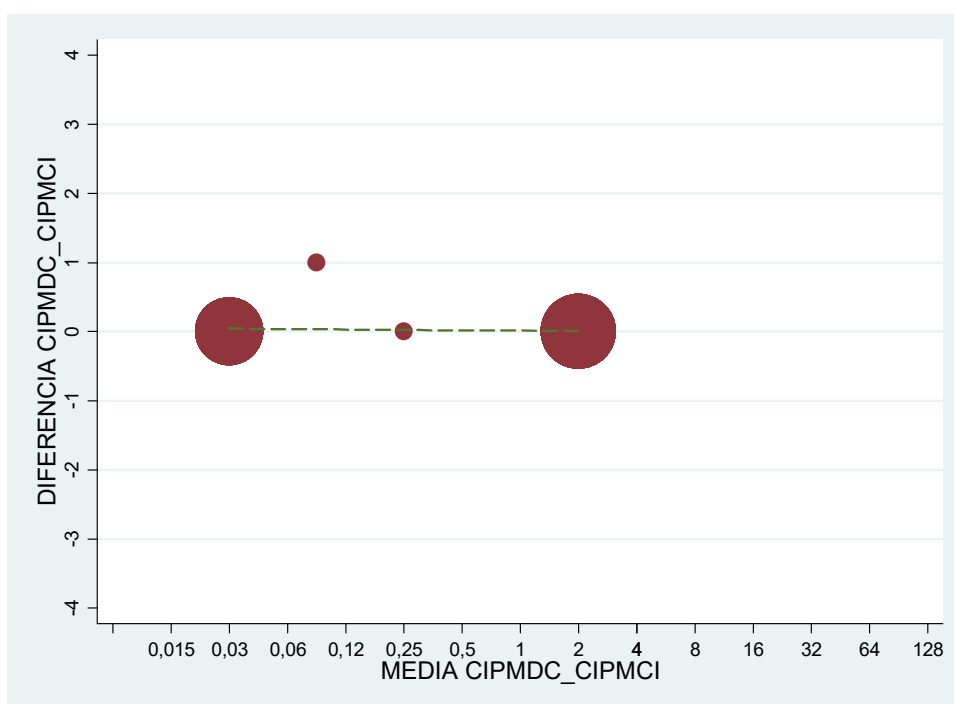
C) Análisis de Bland-Altman para MER.



D) Análisis de Bland-Altman para AK.



E) Análisis de Bland-Altman para CP.



4.2 Características de la determinación de los valores de CMI mediante microcalorimetría isotérmica en cepas multirresistentes

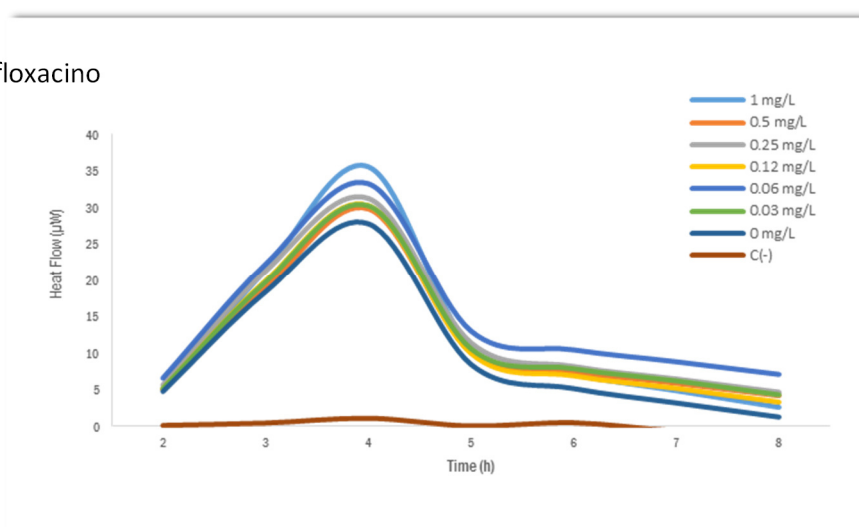
La validación de los parámetros que se utilizaron en el estudio de la CMI empleando CalScreener® se realizó mediante el análisis de 20 aislados obtenidos en nuestra institución, 10 *E. coli* y 10 *K. pneumoniae* (n=10) que presentaban mecanismos de resistencia bien caracterizados, incluyendo carbapenemasas (tabla 12).

El análisis de los resultados en este grupo de aislados reveló que el tiempo medio para detectar la CMI de CP osciló entre 3,5 y 4,5 horas y para detectar la CMI de PTZ osciló entre 4,5 y 6 horas (figura 34). Así mismo, los tiempos medios para detectar las CMI de CTX, MER y AK fueron de 12,2, 13,1 y 9,8 horas, respectivamente, para los aislados de *E. coli*, mientras que para *K. pneumoniae* los tiempos medios para detectar las CMI de CTX, MER y AK fueron de 5, 8,4 y 9,3 horas, respectivamente.

Los termogramas obtenidos de cepas de la misma especie sin presencia de antibiótico fueron similares entre sí. No obstante, entre el termograma de los aislados productores de carbapenemasas respecto a aquellos que no presentan ningún mecanismo de resistencia obtenidos en el apartado anterior encontramos algunas diferencias. En la figura 35 se observa que en el aislado de *E. coli* productor de OXA-48 (*E. coli* 17) la emisión de calor comienza un poco más tarde en comparación con el aislado de *E. coli* que no presenta ningún mecanismo de resistencia (*E. coli* 4). En la figura 36 se observa que en los aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas (*K. pneumoniae* 17 y 18), el final del termograma presenta valores más bajos de flujo de calor en comparación con el aislado que no presenta ningún mecanismo de resistencia (*K. pneumoniae* 2). Además, observando el conjunto de los termogramas que nos proporciona una placa calPlate completa, esto es, comparando los controles positivos y negativos y los pocillos con antibióticos, podríamos inferir fenotípicamente la presencia de algún mecanismo de resistencia (figuras 37 y 38).

Figura 34. A) Tiempo medio necesario para detectar la CMI de ciprofloxacino en *E. coli*. B) Tiempo medio necesario para detectar la CMI de piperacilina-tazobactam en *E. coli*.

A) Ciprofloxacino



B) Piperacilina-tazobactam

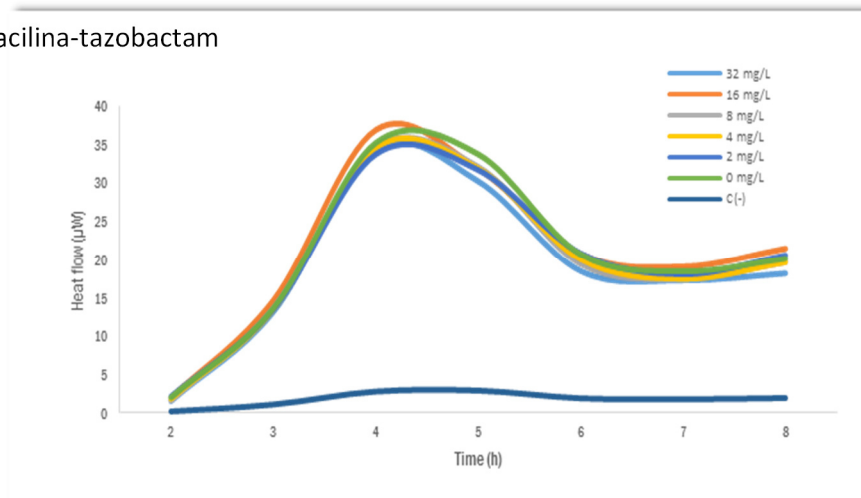


Figura 35. Termograma característico de *E. coli* sin mecanismo de resistencia (MR) (*E. coli* 4) y con OXA-48 (*E. coli* 17).

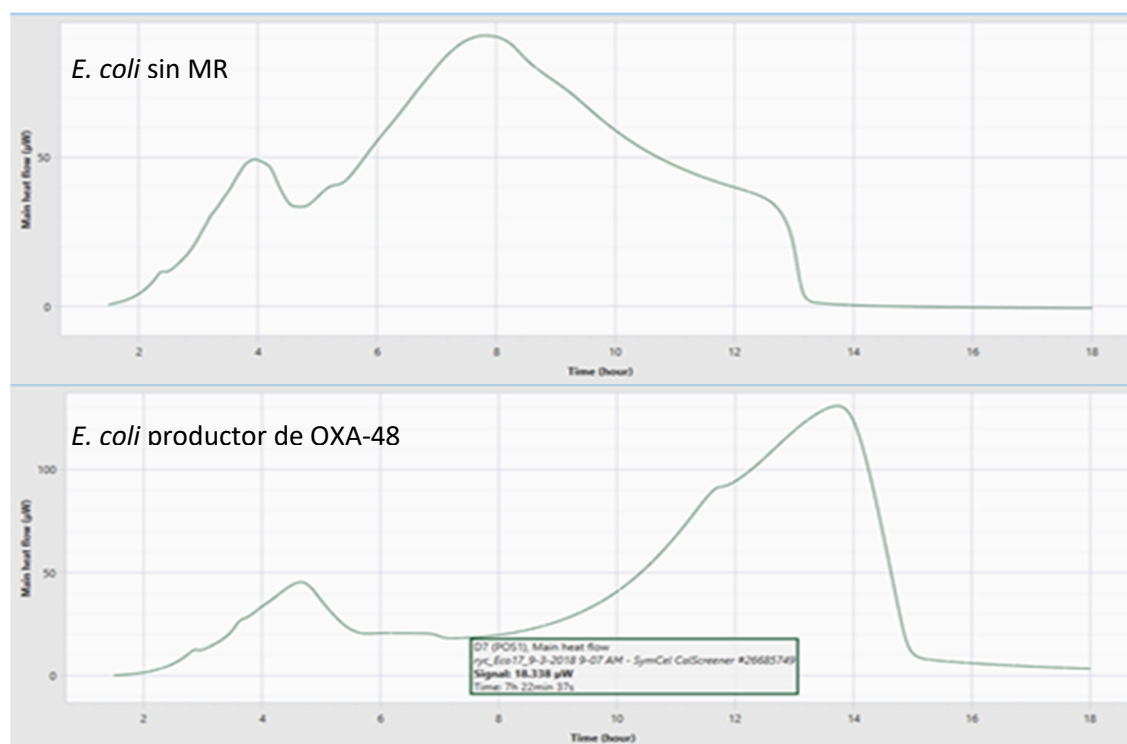


Figura 36. Termograma característico de *K. pneumoniae* sin mecanismo de resistencia (MR) (*K. pneumoniae* 2), con OXA-48 (*K. pneumoniae* 18) o con KPC (*K. pneumoniae* 17).

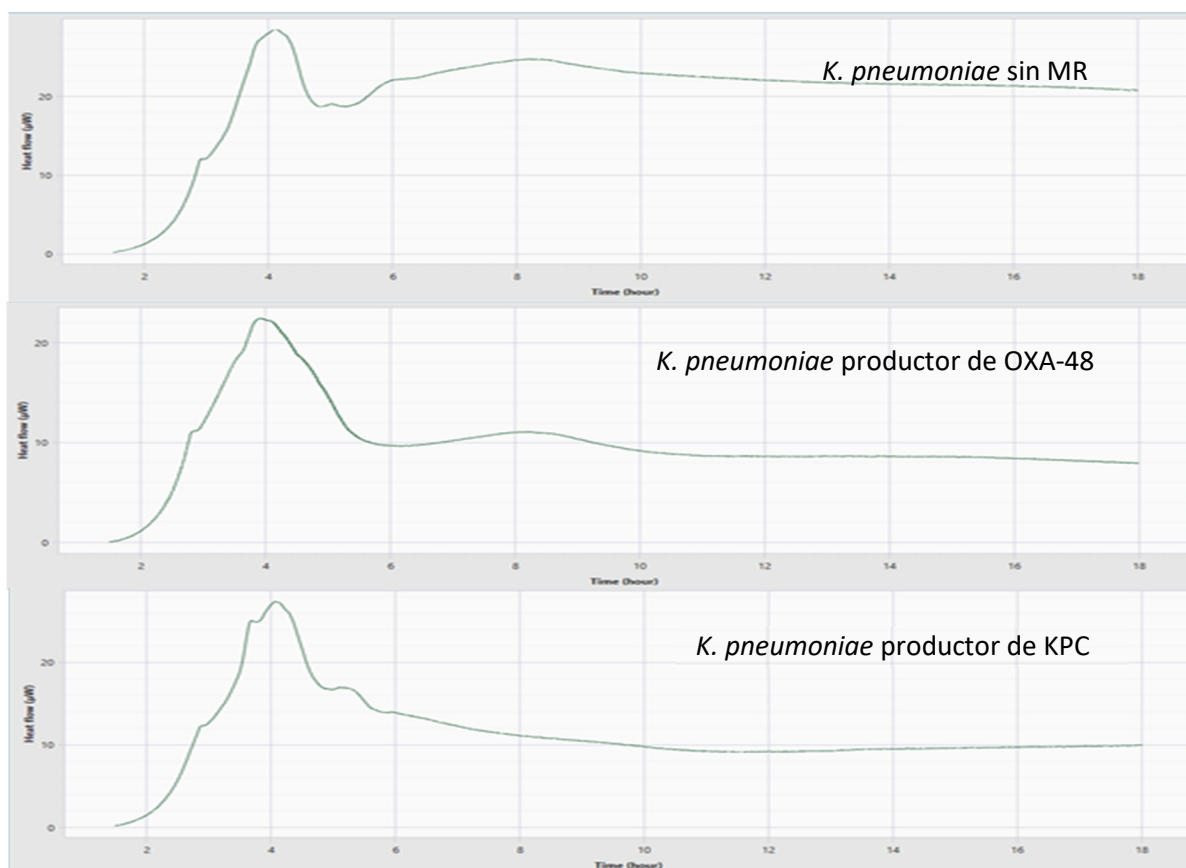


Figura 37. Resultados de CMI obtenidos para un aislado de *E. coli* sin ningún mecanismo de resistencia (MR) (*E. coli* 4) y con OXA-48 (*E. coli* 17).

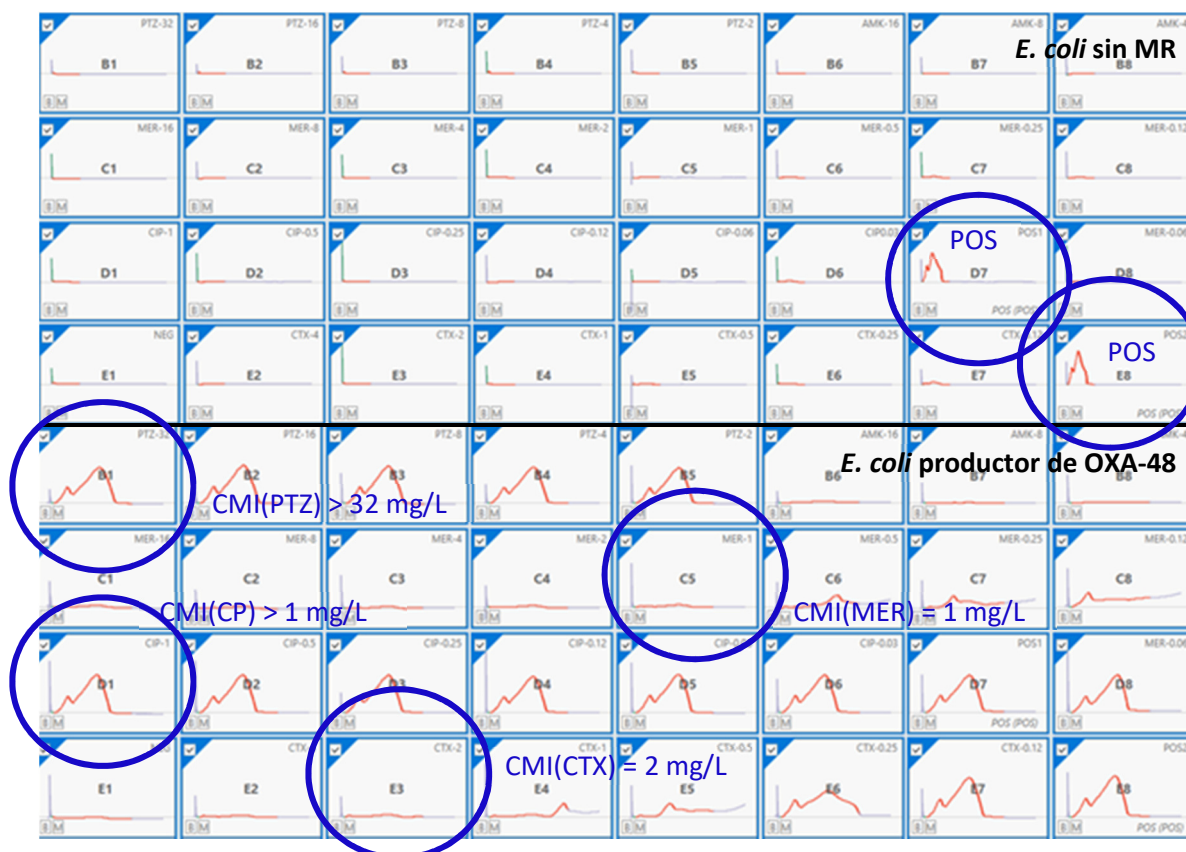
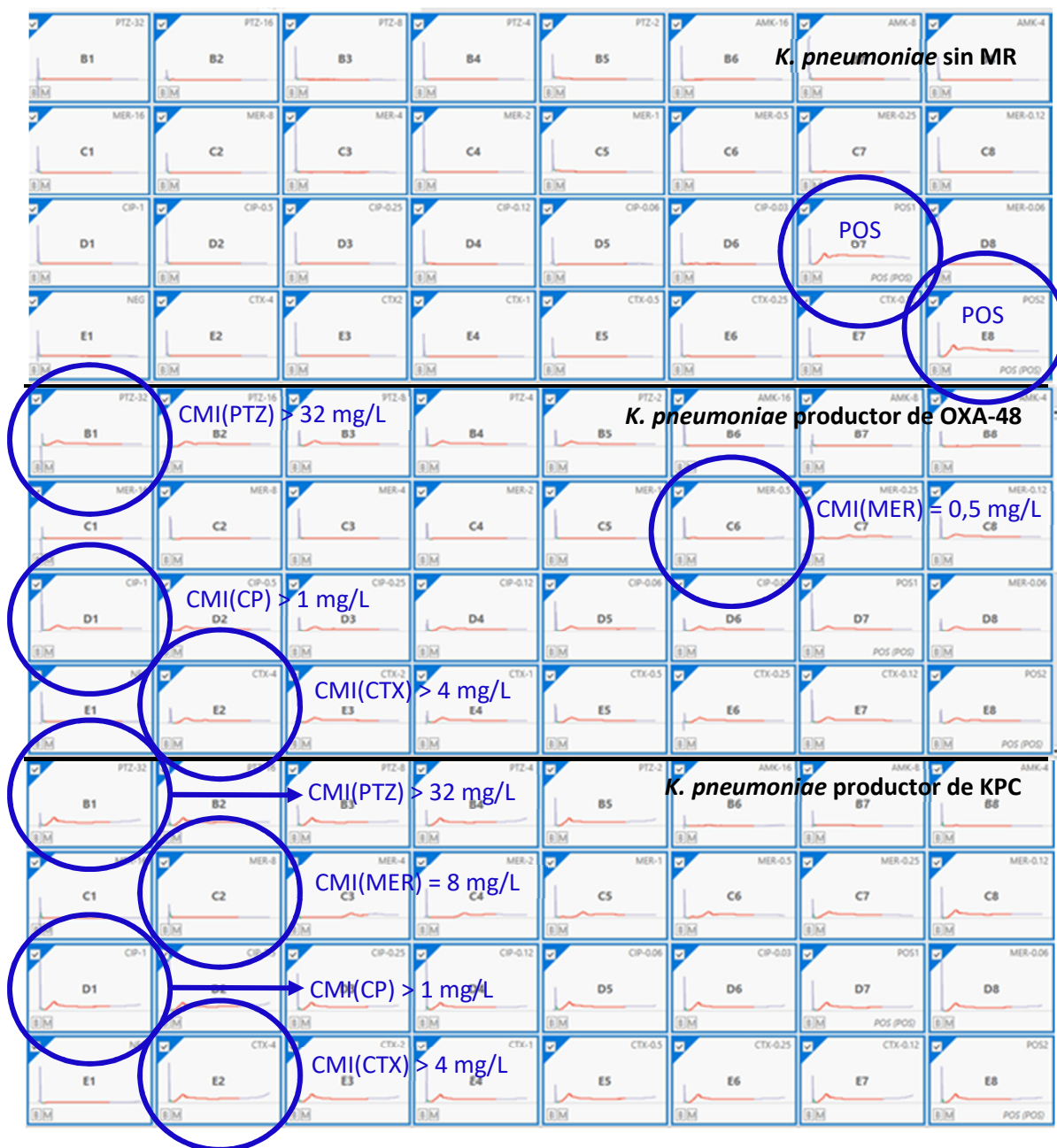


Figura 38. Resultados de CMI obtenidos para un aislado de *K. pneumoniae* sin ningún mecanismo de resistencia (MR) (*K. pneumoniae* 2), con OXA-48 (*K. pneumoniae* 18) o con KPC (*K. pneumoniae* 17).



4.3 Validación del estudio de sinergia mediante microcalorimetría

En el caso de la validación de los estudios de sinergia antibiótica se utilizaron 7 aislados que presentaron BLEE y/o carbapenemasa, estos aislados se seleccionaron en función de la CMI de amikacina. Se considera que una combinación tiene efecto sinérgico cuando $\sum CIF \leq 0,5$.

En la tabla 24 se muestran los resultados de CMI obtenidos empleando la combinación meropenem-colistina. No se obtuvo sinergia en ninguno de los 7 aislados estudiados.

En la tabla 25 se representan las CMIs obtenidas empleando la combinación meropenem-amikacina. Con esta combinación obtuvimos sinergia en un aislado (*K. pneumoniae* 19) únicamente con el método de referencia (microdilución en caldo).

Encontramos dos aislados (*K. pneumoniae* 17 y *K. pneumoniae* 19) en los que se observó diferencia en las CMIs de los antimicrobianos utilizados sin combinación, en ninguno de los dos aislados las diferencias estuvieron en las combinaciones de antibióticos. En el primer caso (*K. pneumoniae* 17) las diferencias estuvieron en las CMIs de meropenem (16 mg/L con el método de referencia y 8 mg/L empleando CalScreener®) y amikacina (8 mg/L con el método de referencia y <4 mg/L empleando CalScreener®). En el segundo caso (*K. pneumoniae* 19) solo encontramos diferencia en la CMI de amikacina (32 mg/L con el método de referencia y 16 mg/L empleando CalScreener®).

Tabla 24. Valores de concentración inhibitoria fraccionada (Σ FIC) obtenidos por microcalorimetría y por la técnica de tablero de ajedrez en el estudio de sinergia de la combinación meropenem-colistina.

Aislado	Método	MER	COL	MER/COL	Σ CIF
<i>E. coli</i> 17	MDC	0,5	0,25	0,5/0,25	2
	MCI	0,5	0,25	0,5/0,25	2
<i>E. coli</i> 19	MDC	1	0,25	0,5/0,25	1,5
	MCI	1	0,25	0,5/0,25	1,5
<i>K. pneumoniae</i> 12	MDC	4	0,5	0,5/0,5	1,125
	MCI	2	0,5	0,5/0,5	1,125
<i>K. pneumoniae</i> 14	MDC	2	0,5	0,5/0,5	1,25
	MCI	2	0,5	0,5/0,5	1,25
<i>K. pneumoniae</i> 16	MDC	0,5	1	0,5/0,5	1,5
	MCI	0,5	0,5	0,5/0,5	1,5
<i>K. pneumoniae</i> 17	MDC	8	0,5	0,5/0,5	1,0625
	MCI	8	0,5	0,5/0,5	1,0625
<i>K. pneumoniae</i> 19	MDC	2	0,5	0,5/0,5	1,25
	MCI	2	0,5	0,5/0,5	1,25

Abreviaturas: MER, meropenem; COL, colistina; MER/COL, combinación meropenem-colistina; MDC, microdilución en caldo; MCI, microcalorimetría isotérmica; CIF, concentración inhibitoria fraccionada.

Las concentraciones utilizadas de meropenem son 0,5-1-2-4-8-16 mg/L. Las concentraciones utilizadas para colistina fueron 0,25, 0,5 y 1 mg/L para *E. coli* y 0,5, 1 y 2 para *K. pneumoniae*.

Tabla 25. Valores de concentración inhibitoria fraccionada (Σ FIC) obtenidos por microcalorimetría y por la técnica de tablero de ajedrez en el estudio de sinergia de la combinación meropenem-amikacina.

Aislado	Método	MER	AK	MER/AK	Σ CIF
<i>E. coli</i> 17	MDC	0,5	8	0,5/1	1,125
	MCI	0,5	8	0,5/1	1,125
<i>E. coli</i> 19	MDC	1	8	0,5/2	0,75
	MCI	1	8	0,5/2	0,75
<i>K. pneumoniae</i> 12	MDC	2	32	2/4	1,125
	MCI	2	32	2/4	1,125
<i>K. pneumoniae</i> 14	MDC	1	32	1/4	1,125
	MCI	1	32	1/4	1,125
<i>K. pneumoniae</i> 16	MDC	<0,5	>16	0,5/4	1,125
	MCI	<0,5	>16	0,5/4	1,125
<i>K. pneumoniae</i> 17	MDC	16	8	2/4	0,625
	MCI	8	<4	2/4	1,25
<i>K. pneumoniae</i> 19	MDC	2	32	0,5/8	0,5
	MCI	2	16	1/4	0,75

Abreviaturas: MER, meropenem; AK, amikacina; MER/AK, combinación meropenem-amikacina; MDC, microdilución en caldo; MCI, microcalorimetría isotérmica; CIF, concentración inhibitoria fraccionada.

Las concentraciones utilizadas de meropenem son 0,5-1-2-4-8-16 mg/L.

DISCUSIÓN

*“Todos nuestros sueños pueden hacerse realidad si
solo tenemos el coraje de perseguirlos”*

Walt Disney

1. Estudio de vigilancia epidemiológica de carbapenemasas

Las EPCs se han convertido en un verdadero problema de salud pública debido a su rápida diseminación a nivel mundial. Su vigilancia y estudio constituyen una prioridad para las autoridades sanitarias debido no solo a las importantes limitaciones terapéuticas que representan y a la necesidad de búsqueda de nuevos antimicrobianos sino también por el reto que supone su detección y control ^{184,236,237}. Existen diferentes tipos de carbapenemasas, siendo su epidemiología variable en diferentes áreas geográficas. Las más prevalentes en Asia y en parte de Europa son las carbapenemasas de tipo MBL, mientras que en los Estados Unidos predominan las de tipo KPC y en los países de la cuenca mediterránea podemos encontrar con mayor frecuencia las enzimas OXA-48 ^{238,239}.

En España, y al igual que en la mayoría de los países europeos, se ha incrementado mucho la presencia de EPCs, especialmente las productoras de OXA-48 en todo el área mediterránea ¹⁸³. En 2009 se llevó a cabo un estudio multicéntrico a nivel nacional y se encontró una prevalencia de 0,04% de enterobacterias (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* y *E. cloacae*) productoras de MBL, concretamente de IMP y VIM-1 ¹⁸². Posteriormente, en un estudio multicéntrico llevado a cabo en 2013 se describió una prevalencia superior de EPCs siendo del 1,7% ²⁴⁰. Asimismo, en el seno del proyecto EuSCAPE impulsado por el ECDC en el que se caracterizaron las diferentes carbapenemasas en aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* recogidas por el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III entre el 1 de noviembre de 2013 y abril de 2014, se demostró que el 69,8% de los aislados eran productores de OXA-48, un 12,1% de enzimas de tipo VIM, un 7,8% de KPC, no detectándose metalo-betalactamasas NDM ⁹⁸. Los resultados de estos estudios de vigilancia epidemiológica en cuanto a la distribución de carbapenemasas son muy similares a los que nos encontraríamos en la actualidad en nuestro hospital. Recientemente el estudio R-Gnosis (Referencia FP7-R-GNO-SIS-282512), proyecto europeo en el que participó nuestro centro y en el que se investigó la colonización en pacientes ingresados en dos Servicios Médicos (Gastroenterología y Neumología) y dos Quirúrgicos (Urología y Neurocirugía) mostró que el 2% de ellos estaban colonizados por EPC. En este estudio, el 64,1% de las EPCs eran productoras de enzimas de tipo OXA-48, el 26,8% VIM y el 3,5% KPC-3 ¹⁷³. Es de resaltar, y en sintonía con lo encontrado en otros trabajos ^{241,242}, que parte de los aislados recogidos en este estudio expresaban más de un tipo de carbapenemasa (0,5% KPC y VIM), denotando el aumento de la complejidad de los aislados de EPCs ¹⁷⁸. En la última clasificación ofrecida por el ECDC en 2015 del nivel epidemiológico de los países europeos en relación a las EPCs, se considera a España con un nivel de dispersión interregional, siendo las carbapenemasas de tipo OXA-48 y VIM las más prevalentes ²⁹. Esta situación podría haber cambiado más recientemente, manteniéndose la OXA-48 como la más importante pero seguida de las VIM y de las KPC. ⁹⁸. Esta última estaría aumentando en áreas muy específicas como Andalucía ²⁴³.

Desde el punto de vista epidemiológico es importante conocer la prevalencia de pacientes colonizados por EPCs para poder establecer medidas de control que eviten su diseminación. Además la colonización por EPCs se ha descrito como un factor de riesgo para desarrollar infección ²⁴⁴. Los estudios ecológicos de resistencia a antimicrobianos incluyen con frecuencia la detección de individuos portadores de microorganismos multirresistentes y la caracterización de los mecanismos im-

plicados. En nuestro hospital se detectó por primera vez en España una epidemia por *Entero-bacterales* productoras de enzimas VIM que implicó diferentes especies y unidades de hospitalización ¹⁶². Nuestro grupo fue pionero en los estudios de colonización de *Enterobacterales* productoras de BLEE ^{245,246} por lo que consideramos necesario en aquel momento y dada la situación epidemiológica realizar este tipo de trabajos en relación a las carbapenemasas y de forma concreta dirigida a las MBL puesto que estas eran casi exclusivamente las carbapenemasas que se detectaban.

La prevalencia de individuos portadores fecales de EPCs en nuestro estudio durante el segundo período (1,5%, 2009-2010) fue inferior a la encontrada en otros países como Francia (5,3%), Egipto (5%), Marruecos (13%) y Pakistán (18%) ²⁴⁷⁻²⁵⁰. Hay que destacar que en nuestro estudio y a diferencia de los anteriores encontramos colonización por EPCs en pacientes extrahospitalarios sin que pudiésemos documentar que tuviesen una infección activa o previa por este tipo de microorganismos. Estos resultados demuestran que, al igual que lo que acontece con pacientes ingresados en los hospitales, podríamos encontrar enmascaradas EPCs en portadores fecales en el medio extrahospitalario sin que estos pacientes presenten una infección por dichos aislados. Así, estos pacientes podrían haber mantenido algún tipo de contacto sociosanitario, bien con hospitales de agudos o centros de larga estancia, favoreciendo la diseminación de este tipo de microorganismos en la comunidad. Asimismo, este tipo de pacientes pueden reingresar en los hospitales socavando las medidas de control de infecciones y complicando la selección de tratamiento empírico, tal como aconteció con las cepas productoras de BLEE en Israel ²⁵¹. Se sabe que el compartimento intestinal puede ser reservorio de microorganismos resistentes, por lo que es importante implementar estudios de vigilancia epidemiológica para detectar portadores fecales tal y como se estableció en Israel dentro del contexto de una epidemia nacional por EPC ²⁵². La contención del brote se consiguió implementando un conjunto de medidas, que además de los cultivos de vigilancia también incluían otras medidas como la declaración obligatoria a las autoridades sanitarias de cada paciente en el que se detectó alguna EPC y el aislamiento obligatorio de los pacientes hospitalizados portadores fecales de este tipo de microorganismos. Además, se creó un grupo de trabajo en Resistencia Antimicrobiana y Control de la Infección formado por expertos en control de la infección, microbiología clínica y Salud Pública. De esta manera disminuyó considerablemente la diseminación de aislados de *K. pneumoniae* resistentes a los carbapenems ^{252,253}. La realización de cultivos de vigilancia cuando la prevalencia aún es baja puede evitar la tendencia a la endemidad, especialmente en las unidades de pacientes críticos ²⁵⁴.

Actualmente la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid en su “Plan de Prevención y Control frente a las Infecciones por Enterobacterias productoras de Carbapenemasas” requiere la declaración obligatoria de los pacientes colonizados o infectados por EPC así como la realización de cultivos de vigilancia epidemiológica, especialmente al ingreso de pacientes con contactos sociosanitario previo <http://www.comunidad.madrid/servicios/salud/prevencion-control-infecciones-epc>).

Para ello, los Servicios/Laboratorios de Microbiología necesitan métodos robustos para la detección de microorganismos productores de carbapenemasas a partir de cultivos de vigilancia, ya que, en algunos casos, la expresión de estas enzimas es muy baja y además puede diferir entre los distintos tipos de enzimas. Generalmente, para los estudios de vigilancia epidemiológica se emplean

medios selectivos diferenciales suplementados con antibióticos para evitar el crecimiento de las bacterias sensibles y seleccionar aquellos que presenten posibles mecanismos de resistencia. En los primeros estudios se empleaba un medio sólido selectivo diferencial (agar MacConkey) suplementado con antibiótico (<https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/mdro/index.html>). Sin embargo, el uso combinado de un caldo de enriquecimiento suplementado con un carbapenem y un medio sólido selectivo diferencial (agar MacConkey) suplementado con ceftazidima podría incrementar la detección de portadores fecales de carbapenemasas. No obstante, la inclusión del medio líquido incrementaba de manera importante la carga de trabajo en el laboratorio. Por ello, algunos autores propusieron el uso de medios cromogénicos para aislados productores de BLEE para la detección de las EPCs ^{255,256}. Sin embargo, estos medios cromogénicos carecían de especificidad para la detección de las diferentes EPCs, incrementando la necesidad de realizar pruebas complementarias para discriminar entre aislados productores de BLEE y aislados productores de carbapenemasas. Tendrían asimismo el inconveniente de no detectar aislados no productores de BLEE con carbapenemasas que afectan poco a las cefalosporinas como OXA-48.

Desde el año 2015 disponemos del procedimiento elaborado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica “Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes” (www.seimc.org). En este documento se recoge cómo se han ido desarrollando a lo largo de estos años medios cromogénicos diseñados para el aislamiento de bacterias productoras de carbapenemasas. Entre los medios descritos se encuentran los medios chromID (bioMérieux, Francia) donde se incluyen el CARBA medium para detectar cepas de KPC y MBL; el OXA-48 medium (bioMérieux, Francia) que es específico para cepas productoras de OXA-48 y CARBA SMART medium (bioMérieux, Francia) que es un medio biplaca que detecta la presencia de carbapenemasas en la mitad de la placa y específicamente la presencia de OXA-48 en la otra mitad. Otros medios disponibles son el medio CRE Brilliant (Thermo Fisher Scientific, UK) y el medio SUPERCARBA (CHROMagar™, Francia) que contiene agar Driglasky, ertapenem, cloxacilina y sulfato de zinc. Excepto CARBA medium y OXA-48 medium (que se deberían usar en conjunto), estos medios presentan una alta sensibilidad para detectar cualquier tipo de EPC con independencia del enzima presente ²⁵⁷. La elección de un medio u otro podría estar condicionada por la situación epidemiológica local de cada centro donde se realiza el cribado, esencialmente por la presencia de enterobacterias productoras de OXA-48.

Por otro lado, disponemos de métodos moleculares que permiten la detección e identificación rápida del tipo específico de carbapenemasas implicadas. Su principal ventaja con respecto a los medios de cultivo es la posibilidad de dar un resultado en un tiempo de entre 1 h y 3 h, además presentan mayor sensibilidad que los métodos basados en cultivo y se pueden utilizar sobre muestra directa. Como inconvenientes, destacar que sólo identifican los genes de resistencia diseñados para el ensayo y que muchas veces podría ser necesario un cultivo posterior para estudios de sensibilidad antibiótica o de tipificación molecular.

En el momento del diseño de nuestro estudio no disponíamos de medios cromogénicos para el aislamiento de EPC, por lo que nuestro trabajo fue planteado siguiendo la metodología recomendada por el CDC (<https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/mdro/index.html>), utilizando un caldo de enriquecimiento suplementado con antibiótico (carbapenémico) y seguido por un medio

sólido suplementado con antibiótico (cefalosporina de espectro extendido). Con este método, identificamos correctamente los aislados productores de metalo-betalactamasas (VIM y NDM) y KPC, incluso cuando los valores de CMI de estos aislados se encontraban por debajo del punto de corte clínico de sensibilidad. Al igual que los resultados obtenidos en otros estudios, una concentración final de 0,5 mg/L de imipenem en los medios de cultivo líquidos sería adecuada para detectar las enterobacterias productoras de MBL en muestras rectales ²⁵⁸. Sin embargo, las posibles variaciones en la sensibilidad de este método para detectar los aislados productores de metalo-betalactamasas apoyarían también la importancia de añadir en paralelo una cefalosporina, como ceftazidima en los métodos de cribado. Este hecho también vendría apoyado por la posible degradación del imipenem a lo largo del tiempo, por lo que en algunos protocolos se recomienda el uso de carbapenems más estables como el meropenem o incluso el ertapenem. Este último sería más sensible pero menos específico al verse también afectado en aislados con alteraciones de permeabilidad ²⁵⁹.

Una limitación del método de cribado empleado en nuestro estudio es la posibilidad de no recuperar aislados productores de OXA-48. Así, con esta metodología, no detectamos la cepa control de *E. coli* productor únicamente de OXA-48 (cedida desinteresadamente por Patrice Nordmann), pero por el contrario sí pudimos detectar un aislado de *E. cloacae* productor de OXA-48 y CTX-M-9 (cedido desinteresadamente por Manuel Rodríguez-Iglesias y Luis Martínez-Martínez). Cabe resaltar que en el momento en el que se planteó el diseño de este estudio, en nuestro centro todavía no se habían detectado enterobacterias productoras de OXA-48.

Por otro lado, con los sistemas de tipificación molecular podemos conocer la relación que existe, clonal o no, entre los aislados estudiados. En este sentido, es importante también conocer los elementos de diseminación horizontal entre bacterias como plásmidos o ETH que contengan genes de resistencia o virulencia, secuencias muy relevantes desde el punto de vista epidemiológico. La aplicación de estas técnicas de tipificación es indispensable para conocer la epidemiología de las bacterias multirresistentes en un área determinada. Nuestro estudio revela que las enzimas tipo VIM-1 se han diseminado en diferentes especies de enterobacterias, siendo *K. pneumoniae* la especie identificada con mayor frecuencia. De todos los clones identificados en *K. pneumoniae*, el clon KPMBL-D asociado con ST163 fue el mayoritario, detectándose en 2010. La ST163 junto con ST253 también detectada en el estudio de forma esporádica en 2009 pertenecían al mismo complejo clonal (CC) CC23 ²⁶⁰. Este complejo clonal incluye las siguientes STs: 23, 26, 45, 57, 137, 217, 163, 217, 218, 240, 245, 253, 260, 371, 398 y 495. Los aislados de *K. pneumoniae* pertenecientes a la secuencia tipo ST253 han sido relacionados con hospedadores humanos, mientras que la ST163 (descrita en nuestro estudio) se han asociado con hospedadores equinos en los Países Bajos (<http://www.mlst.net/>). Además, la ST23 de dicho complejo se ha relacionado con aislados hipervirulentos e hipermucosos de *K. pneumoniae* ^{261,262}. Esto refleja el alto riesgo de que clones específicos penetren y se diseminen tanto en el ámbito hospitalario como extrahospitalario. Hasta donde sabemos, las STs encontradas en nuestro estudio relacionadas con los aislados de *K. pneumoniae* no habían sido asociadas previamente con el gen *bla*_{VIM-1} ²⁶³ (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>). Finalmente cabe destacar, que se identificaron dos pacientes colonizados por el clon de *K. pneumoniae*-ST39 en el año 2006. Este clon fue el responsable de la emergencia de *K. pneumoniae* productora de VIM-1 en nuestro hospital en 2005 ¹⁶². El análisis de la población de *K. pneumoniae*

refleja el aumento de la complejidad a lo largo de los años con la introducción de nuevos clones circulantes.

En cuanto a los dos aislados de *E. coli* productores de VIM-1 uno de ellos perteneció al CC155, normalmente relacionado con infecciones del tracto urinario ²⁶⁰, aunque también se encontró una nueva secuencia tipo (ST2441). *E. coli*-ST155 se ha asociado frecuentemente con la diseminación de *bla*_{CTX-M-14} en voluntarios sanos, lo cual explica el papel de los clones ampliamente diseminados como vehículos de diferentes genes *bla*. Los aislados de *E. cloacae* detectados en el primer período pertenecían al mismo clon que los aislados recogidos durante el brote anterior de nuestro hospital ¹⁶², sin embargo el clon de *E. cloacae* detectado durante el segundo período no mostró tener ninguna relación clonal con los anteriores.

Todos estos resultados están en concordancia con otros datos publicados sobre epidemiología molecular de las EPCs tipo VIM donde tras la emergencia y dominancia de un clon, se describe una situación de policlonalidad a lo largo del tiempo, poniendo de manifiesto la importancia de los elementos de transferencia horizontal en la diseminación de los genes *bla*_{VIM} ²⁶⁴.

Los genes *bla*_{VIM} están frecuentemente en casetes localizados en integrones. En ocasiones, estos integrones llevan otros genes responsables de la resistencia a otras familias de antimicrobianos como pueden ser los aminoglucósidos o las fluoroquinolonas ¹⁶². Se han identificado determinantes *qnr* como mecanismos de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos, junto con la enzima AAC(6')-Ib-cr, una variante de acetiltransferasa capaz de inactivar fluoroquinolonas localizada en integrones ²⁶⁵. Estos dos mecanismos están normalmente asociados con BLEE. En 2010 se publicó un estudio donde se describió la presencia conjunta de VIM-1 y CTX-M por primera vez en cepas de *Klebsiella* y *Enterobacter* ²⁶⁶. Por otra parte, la diseminación de *bla*_{VIM} está asociada a plásmidos pertenecientes a distintos grupos de incompatibilidad que portan estos integrones. Se ha descrito la presencia de VIM en plásmidos IncL, IncHI2, IncN, IncX3, IncC, IncHI1B e IncFIB ^{242,267}. En nuestro caso, describimos la presencia de los integrones Inc110 e Inc113, los cuales ya habían sido identificados en nuestro hospital y en otras instituciones ^{233,268}, este dato sugiere la endemidad de estos elementos y/o de los plásmidos IncN e IncHI2 donde se encuentran localizados. Los plásmidos IncN se asocian cada vez más con genes que codifican carbapenemasas (tanto VIM como KPC) en enterobacterias ^{135,269}. Esto refleja, como se ha demostrado recientemente ²⁷⁰, el alto riesgo de transmisión horizontal intra- e interespecie de genes *bla*_{carbapenemasa} entre plataformas genéticas de éxito, potenciando su diseminación y persistencia.

2. *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de VIM-1 en el Hospital Ramón y Cajal (período 2008-2013)

La emergencia de EPCs ha supuesto un reto diagnóstico para los Servicios/Laboratorios de Microbiología a nivel mundial. Según el estudio multicéntrico europeo (EuSCAPE), los países con mayor incidencia de aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de carbapenemasas se encuentran en el sur y sudeste de Europa. En Grecia, los aislados de *K. pneumoniae* productores de VIM empezaron a aparecer a mediados de los 2000s, pero rápidamente cambió la situación con la emergencia de

aislados productores de KPC en el año 2007, convirtiéndose en la principal enzima encontrada en Grecia. Los aislados productores de carbapenemasas fueron menos frecuentes en *E. coli* que en *K. pneumoniae*. Las enzimas de tipo KPC se localizaron en países con una alta incidencia de *K. pneumoniae* productores de KPC, siendo este tipo de enzimas infrecuentes en aislados de *E. coli*. Se encontraron aislados de *E. coli* productores de OXA-48 en Bélgica, Francia, España, Reino Unido y Turquía, mientras que las enzimas NDM se localizaron en Bulgaria y Serbia ⁹⁸.

Las EPCs se detectaron por primera vez en nuestro hospital en el año 2005, siendo la primera epidemia descrita en España por enzimas de tipo VIM ¹⁶². En 2009 emergen en nuestro centro *Enterobacterales* productoras de KPC, siendo las primeras cepas con esta característica descritas en España ²⁷¹. Con posterioridad, en 2012 se detectaron por primera vez en nuestro centro *Enterobacterales* productoras de OXA-48. Simultáneamente, en un hospital cercano al nuestro, Hospital Universitario La Paz, se estaba produciendo una epidemia por *K. pneumoniae* productora de OXA-48 ²⁷². Ante esta compleja situación planteamos la necesidad de realizar un seguimiento y actualizar los datos microbiológicos en nuestro hospital de los aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de VIM con el objetivo de ver cómo evolucionaba la situación epidemiológica y analizar la situación clonal, es decir, si persistían los clones descritos previamente o aparecían nuevos clones.

Durante este período (2008-2013) detectamos 92 pacientes con colonización o infección por *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de VIM-1, ingresados principalmente en servicios del área médica y quirúrgica, lo que indica la diseminación interhospitalaria de estos microorganismos. La mayor parte de estas cepas presentaron elevados porcentajes de resistencia especialmente en *K. pneumoniae*, a gentamicina, tobramicina, ciprofloxacino y cotrimoxazol. Estos datos de resistencia están en concordancia con los resultados obtenidos en otros estudios nacionales ^{183,273}. Más del 40% de los aislados mostraron resistencia a aztreonam, a pesar de que este antibiótico no se hidroliza por las carbapenemasas del tipo MBL. El 39% (14/36) de estos aislados resistentes a aztreonam co-producían BLEEs del tipo CTX-M y SHV. Asumimos que el resto de aislados (22/36) muestran resistencia a aztreonam debido a pérdida de porinas en el caso de *K. pneumoniae* y por hiperproducción de la betalactamasa plasmídica AmpC en el caso de *E. coli*. Con respecto a los carbapenems, a pesar de la presencia de VIM-1, un 43,3% y un 10,3% de los aislados se mostraron sensibles a imipenem y ertapenem, respectivamente. Este resultado fue muy interesante en el momento del estudio ya que las guías clínicas recomendaban la utilización de un carbapenem (siempre que CMI < 8 mg/L) en combinación con otro antibiótico activo para el tratamiento de las infecciones por EPC ²⁷⁴.

Por otro lado, el análisis de la estructura poblacional puso de manifiesto una elevada diversidad clonal en ambas especies, habiendo encontrado clones de alto riesgo como son *K. pneumoniae*-ST11 y *E. coli*-ST131. En nuestro hospital, como hemos comentado con anterioridad, la emergencia de *K. pneumoniae* productora de VIM-1 se asoció con el clon ST39 en 2005 ²⁶⁸. En el estudio de portadores detectamos dos pacientes colonizados por ST39 en 2006 y este clon todavía circula, especialmente entre 2008 y 2011, aunque se observa un paulatino desplazamiento por otros clones epidémicos que emergen a lo largo del período de estudio. Uno de estos clones es *K. pneumoniae* ST54, que se detecta por primera vez en el año 2009 y persiste a lo largo de todo el estudio. Cabe destacar, la persistencia de este clon en nuestra institución ya que durante el estudio de vigilancia activa R-Gnosis (2014-2016) fue el único clon epidémico asociado VIM-1 ¹⁷³. En la literatura ST54 no es un

clon de *K. pneumoniae* productora de VIM especialmente prevalente. Recientemente, se ha relacionado en China con infección neonatal causada por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa²⁷⁵. Por otra parte, *K. pneumoniae* ST11 y ST15 han sido descritos como clones de alto riesgo y en nuestro hospital emergen entre 2010-2011 persistiendo hasta 2013. Inicialmente, el clon ST11 se relacionó con la diseminación del gen *bla*_{KPC-2} en China aunque también ha sido detectado en otros países^{276,277}. Cabe destacar, que esta ST se ha asociado a la diseminación de genes que codifican varios tipos de betalactamasas como son *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} y *bla*_{OXA-48}^{180,278-280}. En nuestro hospital, ST11 se había encontrado previamente en aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC-3²⁸¹ y posteriormente estuvo implicada en la dispersión de enterobacterias productoras de OXA-48¹⁷³. Por otra parte, *K. pneumoniae* ST15, también se ha asociado con la dispersión de diferentes tipos de carbapenemasas. *K. pneumoniae*-ST15 productora de VIM-1 originó un importante brote en un hospital madrileño en 2009¹⁶³. Este clon también se ha detectado colonizando a pacientes ingresados en hospitales de larga estancia en la Comunidad de Madrid asociado con VIM-1 y OXA-48.²⁸² Un estudio publicado recientemente pone de manifiesto la importancia de los clones ST11 y ST15 de *K. pneumoniae* en la dispersión de carbapenemasas en los hospitales europeos²⁸³.

Con respecto a los aislados de *E. coli* se observa una mayor diversidad clonal en comparación con *K. pneumoniae*, sin una aparente persistencia de los mismos a lo largo del tiempo. Cabe destacar la presencia (aunque esporádica) del clon de alto riesgo ST131. Este clon se ha asociado mayoritariamente con infecciones del tracto urinario y bacteriemias producidas por aislados productores de BLEE. En un estudio llevado a cabo en nuestra institución se observó que más de la mitad de las bacteriemias de origen urinario fueron causadas por el clon multirresistente ST131²⁸⁴, estando implicado en la diseminación del gen *bla*_{CTX-M-15}. Recientemente se ha descrito un 8,8% de portadores fecales (mujeres sanas) de *E. coli* resistente a fluoroquinolonas, la mayoría de los aislados pertenecientes a los clones pandémicos ST131-H30R y ST1193. Además estos clones, altamente uropatógenos, han demostrado tener una persistencia intestinal especialmente prolongada y una alta tasa de bacteriuria sin infección urinaria documentada²⁸⁵. Aunque *E. coli*-ST131 es un clon de diseminación mundial, principalmente relacionado con la diseminación de CTX-M-15, su asociación con carbapenemasas aún es baja. No obstante, su persistencia en la microbiota intestinal facilitaría la adquisición de otros genes de resistencia, como *bla*_{VIM}.

Los resultados de este trabajo refuerzan la idea de la importancia de los clones de alto riesgo en la diseminación de las carbapenemasas. Hemos comprobado la existencia clones epidémicos productores de VIM-1 que persisten a lo largo del tiempo y están diseminados tanto en hospitales de agudos como de larga estancia, lo que sugiere una alta circulación de los mismos. Asimismo, la capacidad de estos clones de portar distintos tipos de carbapenemasas aumenta la complejidad de estas poblaciones, especialmente en la ecología hospitalaria.

Por otra parte, junto con los clones de alto riesgo, los plásmidos son otras importantes plataformas genéticas implicadas en la diseminación de las carbapenemasas. Los genes *bla*_{VIM} generalmente están localizados en integrones de tipo 1, que se han diseminado a nivel mundial entre distintas especies de *Enterobacterales*. En nuestro trabajo, en más de la mitad de los aislados (56%) el gen *bla*_{VIM} estaba localizado en plásmidos del grupo de incompatibilidad IncL/M, mientras que en el resto de aislados estos genes se localizaron plásmidos del tipo IncN (11%), IncHI2 (6%) e IncFIK (3%).

Durante este período aparecieron nuevos tipos de plásmidos que portaban los genes *bla_{VIM}*, manteniéndose, aunque en menor proporción, los descritos en el estudio de portadores. Estos resultados son similares a los descritos con anterioridad, donde estudios de secuenciación de genomas completos han descrito la asociación de los genes *bla_{VIM}* con plásmidos del grupo de incompatibilidad IncL, aunque también podemos encontrar el gen en otro tipo de plásmidos como IncR, IncHI1B, IncFIB, IncX3 e IncC. Algunos plásmidos (IncC, IncL e IncN) se asocian a distintas especies en diferentes integrones mostrando una diseminación a nivel global. Sin embargo, hay plásmidos cuya localización está limitada a ciertas áreas geográficas, por ejemplo, el plásmido IncFIIk con el integrón In1310 se ha localizado en Filipinas mientras que los plásmidos IncHI1B-IncFIB(Mar) con el integrón In1209 e IncR con el integrón 591 se han localizado en Grecia ^{267,286}. Por otro lado, los genes *bla_{VIM}* pueden estar localizados en otro tipo de plásmidos, en el estudio de vigilancia epidemiológica SMART (*Study of Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*), los plásmidos estudiados que portaban los genes *bla_{VIM}* presentaron un tamaño comprendido entre 60 y 300 Kb y pertenecieron los grupos de incompatibilidad IncA/C, IncF (con replicones FIIk) e IncHI1 ²⁸⁷, siendo estos plásmidos diferentes a los descritos en este trabajo.

3. Estudio de aislados clínicos productores de OXA-48.

Actualmente el mayor problema de salud pública en España debido a las EPCs se debe a la aparición y rápida diseminación de las enzimas de tipo OXA-48. El primer caso en España, fue un paciente que había sido trasladado de Marruecos a Barcelona en el que en un cultivo de catéter se aisló *K. pneumoniae*-ST101, que además producía CTX-M-15 y era deficiente en porinas ²⁸⁸. Posteriormente, se describió un importante brote en el Hospital Universitario La Paz, originado principalmente por *K. pneumoniae*-ST405 ²⁷². A pesar de la cercanía entre el Hospital Universitario La Paz y el Hospital Universitario Ramón y Cajal, nosotros tardamos algo más en detectar OXA-48. Desde entonces, se ha producido una diseminación interregional de *K. pneumoniae* productora OXA-48 y actualmente son las enzimas más prevalentes entre las EPCs en nuestro país y han ido produciendo distintos brotes debidos a *K. pneumoniae* agrupadas en clones de alto riesgo como los ya descritos ST11 y ST15 o ST16 y ST405 ¹³⁰.

La detección de aislados de enterobacterias productoras de OXA-48 ha supuesto un reto para los Servicios/Laboratorios de Microbiología, especialmente entre aquellos aislados no portadores de BLEE en los que no se afectan las cefalosporinas de espectro extendido y los valores de CMI a los carbapenems pueden estar, hasta incluso por debajo del punto de corte. No obstante, estas cepas presentan una alta asociación, sobre todo en *K. pneumoniae* con la producción de BLEE. Las enzimas OXA-48 no son inhibidas por el ácido clavulánico, ácido fenil borónico, cloxacilina, EDTA o ácido dipicolínico, pero suelen presentar resistencia de alto nivel a temocilina. En nuestro estudio para la identificación fenotípica de estas enzimas implementamos como técnica el estudio de la sensibilidad a la temocilina poder detectar la presencia de OXA-48 en aislados que tienen una prueba Carba NP positiva con resultados negativos para el cribado de MBL y KPC ^{289,290}. Desde entonces, la mayor

parte de los aislados productores de OXA-48 se detectan con esta técnica, ya sea con tiras de gradiente (todos los aislados testados presentan una CMI > 128 mg/L) o con disco (en todos los aislados se observa ausencia de halo de inhibición).

Durante el período de estudio (marzo 2012-diciembre 2013) la prevalencia de carbapenemasas en nuestra institución fue del 0,4%, siendo OXA-48 la enzima más prevalente (datos no publicados del Servicio de Microbiología). En nuestro hospital detectamos por primera vez enzimas de tipo OXA-48 en una cepa de *K. aerogenes* productora de OXA-48 y CTX-M-15 aislada de un urocultivo de un paciente ingresado en el Servicio de Urología en abril de 2012. Al mes siguiente, en este mismo paciente se aisló *K. pneumoniae* productora de OXA-48 en un hemocultivo y en muestras de control epidemiológico. A pesar de la instauración de medidas de contención (aislamiento de pacientes colonizados e infectados y precauciones de contacto) rápidamente estos aislados productores de OXA-48 se dispersaron por diferentes Servicios del hospital. Inicialmente, todos los aislados de *K. pneumoniae*-OXA-48 fueron identificados como un mismo clon de *K. pneumoniae* (KP-A) agrupado en la ST11. Cabe destacar que estos aislados presentaron unos patrones de PFGE similares a los encontrados previamente en nuestra institución en aislados de *K. pneumoniae*-ST11 productores de KPC²⁸¹, y en aislados de *K. pneumoniae*-ST11 productores de CTX-M-15 en muestras de vigilancia epidemiológica (datos no publicados) lo que nos sugiere la circulación de un *pool* clonal local que juega un importante papel en la diseminación de nuevos determinantes de resistencia, tal como ocurrió con OXA-48. Posteriormente, en julio de 2012 se detecta por primera vez *K. pneumoniae*-ST405. Como hemos comentado con anterioridad, este clon, fue identificado previamente en el Hospital La Paz (a 500 metros de nuestra institución) y fue el responsable de su situación endémica²⁷². Sin embargo, a pesar de la proximidad de los dos hospitales, los aislados de *K. pneumoniae*-ST405 presentaron diferentes patrones de PFGE, sugiriendo eventos de introducción independientes (datos no publicados). Al final del estudio se detecta la emergencia de *K. pneumoniae*-ST307, este clon se ha asociado a la dispersión de enzimas de tipo KPC-3^{282,291} y más recientemente a la resistencia a cef-tazidima-avibactam^{291,292}. Nuestros resultados subrayarían la importancia del seguimiento de los clones locales circulantes que pueden contribuir a la difusión y mantenimiento de las bacterias multirresistentes.

Actualmente, nuestra institución presenta una situación endémica de enterobacterias productoras de OXA-48¹⁷³. Desde su primera detección en 2012, la dispersión de los genes *bla*_{OXA-48} ha sido rápida y no sólo se ha ligado a su diseminación en múltiples clones de *K. pneumoniae*, sino también en otras especies de enterobacterias. En este trabajo OXA-48 también se ha detectado en otras especies de forma minoritaria como en *E. coli*, *K. aerogenes* o *E. cloacae*. En *E. coli*, al igual que ya hemos descrito entre la población productora de VIM-1, se detecta una gran diversidad clonal sin la existencia de poblaciones de carácter epidémico. Como vemos, esta alta capacidad de dispersión de los genes *bla*_{OXA-48} ha ido dando lugar a un escenario epidemiológico altamente complejo en el que coexisten múltiples especies de enterobacterias, clones y elementos genéticos¹⁷³.

De esta forma, en la mayoría de los aislados productores de OXA-48 detectamos la presencia del gen *bla*_{CTX-M-15}. La producción simultánea de OXA-48 y CTX-M-15 ha sido previamente descrita en *Enterobacterales*^{293,294}. Sin embargo, en nuestro plásmido, pRYC-OXA-48, el gen *bla*_{CTX-M-15} está aso-

ciado con la secuencia de inserción *ISEcp1* pero sin interrumpir el transposón *Tn1999.2*, el cual contiene el gen *bla*_{OXA-48}. Esta configuración *Tn1999.2-bla*_{OXA-48}, donde la secuencia de inserción *IS1999* es truncada por la región *IS1R*, ya había sido descrita con anterioridad en *Enterobacterales*^{77,235,295}. La comparación de nuestro plásmido con otros descritos nos indicó una estructura similar, compartiendo el esqueleto del plásmido portador de OXA-48 tipo IncL. Esto está en consonancia con lo descrito previamente, los plásmidos portadores del gen *bla*_{OXA-48} de distintos clones de *K. pneumoniae* circulando por diferentes países podrían compartir características genéticas, estando asociada la diseminación de los genes *bla*_{OXA-48} a la transmisión de un solo plásmido conjugativo del tipo IncL⁸⁰.

Es importante destacar que a lo largo del estudio hemos detectado aislados (4 *K. pneumoniae* y 3 *E. coli*) que producían VIM-1 a la vez que OXA-48, y además de ellos, 6 también producían CTX-M-15 (4 *K. pneumoniae* y 2 *E. coli*). La presencia de más de un gen codificante de betalactamasas en estos aislados podría explicarse por la situación endémica que tenemos en nuestro hospital donde están implicados los genes *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} y *bla*_{CTX-M-15}^{162,220,281}. La presencia de ambos genes (*bla*_{VIM} y *bla*_{OXA-48}) en el mismo aislado incrementa la dificultad de reconocer fenotípicamente la producción de OXA-48 o VIM. En este sentido, las pruebas de doble difusión con discos de EDTA no fueron completamente fiables para la detección de aislados productores de VIM, ya que en nuestro estudio obtuvimos 5/7 falsos negativos. La producción simultánea de OXA-48 y VIM-1 ha sido descrita en muy pocas ocasiones^{296–299} pero podrían darse más casos en el futuro. Recientemente, el Laboratorio de Referencia e Investigación en Resistencia a Antibióticos del Instituto de Salud Carlos III ha realizado un estudio cuyo objetivo fue caracterizar microbiológicamente y estudiar la epidemiología molecular de los aislados de *K. oxytoca* procedentes de distintas regiones de España. De los 80 aislados estudiados, dos producían VIM-1 y KPC-2, uno producía VIM-1 y KPC-3 y otro VIM-1 y OXA-48²⁴². También se ha descrito la asociación de dos carbapenemasas (KPC con OXA-48) en Grecia donde tienen una situación endémica por este tipo de microorganismos³⁰⁰. Curiosamente, los genes *bla*_{OXA-48} y *bla*_{VIM-1}, normalmente asociados en nuestro trabajo a *K. pneumoniae*-ST11, se encontraban en el mismo plásmido. Esto podría deberse a la situación de endemidad existente durante el estudio debido a *K. pneumoniae*-ST11 productor de VIM-1 o a la integración del gen *bla*_{VIM} en los plásmidos que presentaba el gen *bla*_{OXA-48}. Los plásmidos detectados en nuestro estudio (entre los aislados con diferentes patrones de PFGE) mostraron un alto grado de similitud con otros plásmidos portadores de OXA-48 descritos con anterioridad, incluso con aquellos que codifican los genes *bla*_{VIM-1} y *bla*_{CTX-M-15}. Esto indica que la diseminación de OXA-48, normalmente vinculada a otras betalactamasas, se asocia no solo con la diseminación de clones de alto riesgo sino también con la diseminación de plásmidos altamente transmisibles, como ha sido descrito previamente⁸⁰. Cabe destacar que en nuestra institución este plásmido portador de OXA-48 se ha diseminado en diferentes clones de alto riesgo (ST11, ST307 y ST405), alguno de los cuales (ST11) ya circulaba en nuestro entorno con otros mecanismos de resistencia como CTX-M-15 y KPC-3.

4. Estudio de aislados clínicos mediante microcalorimetría isotérmica

La identificación de aislados multirresistentes, como son las EPCs, es fundamental en los Servicios/Laboratorios de Microbiología teniendo gran trascendencia clínica y epidemiológica. Por las características de este mecanismo de resistencia y su influencia a la hora de elegir el tratamiento antibiótico adecuado, se necesitan pruebas fenotípicas precisas y rápidas que permitan establecer lo antes posible el tratamiento antibiótico dirigido y que también respondan a la necesidad clínica de estudios de sinergias (combinación de antimicrobianos). A pesar de la introducción de ceftazidima-avibactam en el arsenal terapéutico, se sigue recomendando el uso de combinaciones de antimicrobianos en el tratamiento de las EPCs ³⁰¹.

En el caso de las EPCs, se han propuesto varias técnicas rápidas para el estudio de los perfiles de sensibilidad de este tipo de aislados, entre ellas encontramos lecturas precoces de los valores de CMI o halos de inhibición de difusión con disco o técnicas más novedosas como la citometría de flujo ¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Algunos de estos métodos tienen como objetivo detectar o no la presencia de carbapenemasas y solo unos pocos son capaces de establecer el valor de la CMI. Uno de los métodos innovadores más recientes en el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y que también responde a la necesidad clínica de la realización de estudios de sinergias es la calorimetría isotérmica ¹⁸⁹. Esta técnica no ha sido aplicada por el momento al estudio de sensibilidad de las EPCs ni a las combinaciones de los antimicrobianos.

La calorimetría isotérmica mide el flujo de calor de cualquier proceso biológico de forma proporcional a la velocidad a la que tiene lugar un proceso dado, ya sea físico o químico. Todas las células vivas producen calor en cada proceso fisiológico, por tanto, a través de la monitorización del flujo de calor en función del tiempo podemos obtener cierta información sobre los sistemas biológicos. En el caso de las bacterias ese flujo de calor cambia cuando se someten a la acción de los antimicrobianos que podría ser diferente con distintas concentraciones de antimicrobianos. En nuestro estudio utilizamos esta particularidad para poder establecer los valores CMI.

El estudio de la combinación de antimicrobianos se sustentaría en la necesidad de realizar tratamientos combinados en la mayoría de situaciones clínicas en las que están implicadas las EPCs, tal como indican las guías clínicas y revisiones del manejo de las infecciones producidas por EPC ^{302,303}. Por ello, y en el seno del proyecto BADGER (H2020-SMEINST-2-2016-201; Ref 784514), planteamos la posibilidad de estudiar combinaciones de antibióticos para el tratamiento de las infecciones producidas por microorganismos productores de carbapenemasas.

A pesar de sus posibles limitaciones, la MCI es una técnica que ofrece varias ventajas a los Laboratorios/Servicios de Microbiología ya que es un método versátil de alta precisión, que puede proporcionar datos de manera continua. Se ha probado de manera eficiente en varios campos de la microbiología, permitiendo monitorizar *in situ* la actividad metabólica de los diferentes aislados con un bajo límite de detección. Entre los parámetros utilizados el flujo de calor refleja las tasas metabólicas y, por otro lado, el calor total indica la cantidad de sustrato consumido o los productos metabólicos generados.

Recientemente se ha descrito la MCI como una herramienta capaz de detectar la presencia de microorganismos persistentes en un *biofilm* tras el tratamiento con antimicrobianos, demostrando que podría ser una tecnología adecuada no solo para ver actividad *anti-biofilm* sino también como método de cribado en el desarrollo de moléculas *anti-biofilm*. En un trabajo de MCI con *Staphylococcus aureus* formador de *biofilm* se ha descrito que la escasa eficacia de vancomicina *in vitro* contra este patógeno podría deberse a la presencia y/o selección de células persistentes en lugar del desarrollo de resistencia o una mala penetración del antibiótico. Esto podría explicar la alta tasa de fallo terapéutico de este glucopéptido administrado solo en la práctica clínica habitual en contraposición a lo que acontece cuando se administra en combinación, por ejemplo con rifampicina ³⁰⁴.

Por otro lado, se ha descrito la MCI como una herramienta útil en el campo de la parasitología. Se ha utilizado calScreener™ para demostrar la viabilidad de los ancilostomas *Necator americanus* y *Ancylostoma ceylanicum* así como de *Trichuris muris*. Se pueden obtener señales significativas de flujo de calor con un solo adulto de cada una de las especies. Así, el flujo de calor para los ancilostomas tratados con levamisol aumenta de manera proporcional a las concentraciones de ivermectina ³⁰⁵.

Además, la MCI se ha evaluado como método de determinación de la sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido a través de la detección en tiempo real del calor producido. El tiempo medio para detectar el crecimiento de *Mycobacterium abscessus* fue de 16,5 h y la detección de calor se retrasó en el tiempo de manera proporcional a la concentración de antibióticos empleada en el ensayo ³⁰⁶.

No obstante, probablemente debido al elevado coste de los sistemas de microcalorimetría isotérmica multicanal, la MCI aún no es una técnica común en los Servicios/Laboratorios de Microbiología. Parecería lógico pensar que en el momento en el que aumente la demanda de este tipo de equipos disminuiría el coste de los mismos ¹⁹⁰.

En nuestro estudio, en todos los experimentos con los diferentes aislados obtuvimos datos reproducibles con los ensayos de MCI. Potencialmente, el termograma puede utilizarse para evaluar el efecto de los antimicrobianos en el crecimiento bacteriano y la duración de la fase logarítmica podría utilizarse para estimar la carga bacteriana en una muestra o el efecto bactericida de una manera más rápida y tan fiable como los métodos convencionales utilizados para el cribado de mecanismos de resistencia ³⁰⁷.

Debido a que la MCI aún no se utiliza para la determinación de los perfiles de sensibilidad, en nuestro trabajo quisimos estudiar la correspondencia entre este método y el método de referencia (microdilución en caldo). Para ello, se calculó el acuerdo esencial, acuerdo de categoría y la tasa de errores, y además, tuvimos en cuenta otros parámetros estadísticos como el análisis de Bland-Altman al comparar ambas técnicas. Los resultados obtenidos mediante MCI fueron comparables a los obtenidos mediante microdilución en caldo; tuvimos valores de acuerdo esencial del 100% en todos los antimicrobianos estudiados, tanto en los aislados que no presentaban mecanismos de resistencia como en aquellos que sí los presentaron. En ambos grupos, los valores de acuerdo de categoría fueron muy similares al igual que la tasa de errores. Basándonos en el análisis de Bland-Altman obtuvimos una buena concordancia entre los dos métodos ya que todos los puntos se encontraron

dentro del rango del acuerdo esencial (± 1 CMI). En el caso de meropenem, se observó que la microcalorimetría ofrecía valores de CMI ligeramente menores con respecto a la microdilución en caldo en aquellos aislados productores de carbapenemasas que presentaron valores de CMI más elevados.

Con respecto a los estudios de sinergia, obtuvimos resultados concordantes con ambos métodos. Los valores de concentración inhibitoria fraccionada obtenidos fueron iguales para ambos métodos salvo en dos aislados en la combinación meropenem-amikacina. En uno de estos aislados obtuvimos efecto sinérgico ($\Sigma \text{CIF}=0,5$) solo con el método de referencia. En el resto de aislados no obtuvimos efecto sinérgico y tampoco en la combinación meropenem-colistina. En un futuro será necesario profundizar más en el estudio de sinergias ampliando las concentraciones de antimicrobianos y estudiando otro tipo de combinaciones.

Por otro lado, la determinación de la CMI mediante MCI tiene como ventaja añadida la posibilidad de evaluar el efecto de las concentraciones subinhibitorias de los antibióticos en la actividad termodinámica relacionada con el crecimiento de las bacterias, es decir, se podría estudiar el efecto de estas concentraciones subinhibitorias en el metabolismo de la bacteria mediante la evaluación del efecto que tienen las mismas en la fase estacionaria. Además, es una técnica con la que se podrían reducir los tiempos de determinación de las CMIs, así, podría desarrollarse un método capaz de analizar los resultados de las primeras horas de la técnica de una serie de concentraciones de antibióticos y extrapolar los valores de CMI. Por otro lado, conociendo la constante de disociación de los antibióticos sería posible cuantificar el efecto inhibitorio utilizando los métodos descritos por Antoce y cols³⁰⁸, esto podría ayudarnos a la hora de extrapolar los valores de CMI para un antibiótico dado.

Nuestro trabajo es el primer estudio a gran escala que aplica la MCI al estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos en microbiología clínica. Con los resultados obtenidos tuvimos un 2,2% de errores menores para todos los antimicrobianos a excepción de ciprofloxacino. Sin embargo, no obtuvimos ningún error mayor ni grave. Además, obtuvimos valores de AE del 100% y los valores de AC fueron cercanos al 100%, por lo que se podría utilizar esta tecnología para la determinación de las CMIs a los antimicrobianos, siendo más interesante aún la posibilidad de estudiar combinaciones de antimicrobianos, dado la situación endémica debido a EPCs que presentan distintas instituciones de diferentes países. Los valores de AE en los aislados que presentaban algún mecanismo de resistencia se mantuvieron en el 100% y los valores de AC cercanos al 100%, por lo que deducimos que en la MCI no hay diferencias entre los resultados obtenidos en aislados con fenotipo salvaje y los obtenidos en aislados que presentaron algún tipo de carbapenemasa y/o BLEE. Por todo ello, y a pesar de las limitaciones ya conocidas, proponemos la evaluación en profundidad de esta tecnología para determinar sus posibles limitaciones a la hora de introducirla en el entorno clínico.

EPÍLOGO

“La satisfacción radica en el esfuerzo, no en el logro. El esfuerzo total es una victoria completa”

Mahatma Gandhi

Este trabajo está alineado con los objetivos planteados por la Organización Mundial de la Salud en la lucha frente a la rápida diseminación de las bacterias multirresistentes, especialmente de las *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas (EPCs) ³⁰⁹. Su vigilancia y estudio constituyen una prioridad para las autoridades sanitarias debido a: i) las importantes limitaciones terapéuticas que representan, ii) la necesidad de búsqueda de nuevos antimicrobianos y iii) el desafío que supone su detección en los laboratorios de microbiología y control por los equipos de infección.

La emergencia de las EPCs ha supuesto un reto diagnóstico para los Servicios/Laboratorios de Microbiología, siendo necesario conocer su expresión fenotípica, estructura poblacional, así como los elementos genéticos que portan los genes responsables de la producción de estas enzimas. Asimismo, desde un punto de vista epidemiológico es preciso conocer la proporción de pacientes colonizados por este tipo de microorganismos para poder establecer medidas de control que eviten su diseminación.

Nuestro hospital ha sido pionero en el estudio de las *Enterobacterales* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y en particular de las enzimas de tipo CTX-M ¹³¹. Demostramos su emergencia, diseminación, estructura poblacional y trayectorias evolutivas. Con ese modelo y ante la aparición en nuestro hospital de las carbapenemasas de tipo VIM en 2005 ²⁶⁸, de tipo KPC en 2009 ²⁷¹ y de la OXA-48 en 2012 (datos no publicados) se iniciaron diferentes estudios que permitiese ampliar nuestro conocimiento y establecer medidas para un mejor control. Nuestros resultados demuestran la complejidad presente en la epidemiología de este tipo de microorganismos y respaldan la necesidad de mantener un seguimiento activo de los clones locales circulantes que pueden contribuir al mantenimiento de las bacterias multirresistentes. Hemos puesto de manifiesto la presencia de portadores fecales de EPC tanto en el hospital como en la comunidad. También una alta diversidad clonal en los aislados de EPCs, habiendo encontrado clones emergentes y epidémicos productores de estas enzimas que persisten a lo largo del tiempo y están ampliamente diseminados, lo que sugiere una alta circulación de los mismos. Asimismo, la capacidad de estos clones de portar distintos tipos de carbapenemasas aumenta la complejidad de estas poblaciones, especialmente en la ecología hospitalaria.

Por otra parte, y debido al perfil de multirresistencia que presentan las EPC es necesario disponer en los Servicios/Laboratorios de Microbiología de técnicas innovadoras rápidas para el estudio de sensibilidad y que también respondan a la necesidad clínica de la realización de estudios de sinergias (combinación de antimicrobianos). Nuestro trabajo, en el seno de un proyecto europeo (H2020-SMEINST-2-2016-201; Ref 784514) es el primer estudio que aplica la microcalorimetría (MCI) al estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos en un laboratorio de microbiología clínica. Con nuestros resultados concluimos que la MCI puede determinar con precisión los valores de CMI, pudiéndose convertir en una alternativa de futuro a los métodos convencionales de microdilución en bacterias multirresistentes, con el añadido de su posible utilidad en el estudio del efecto sinérgico a los antimicrobianos.

CONCLUSIONES

“Lo poco que he aprendido carece de valor comparado con lo que ignoro y no desespero en aprender”

Descartes

1. El estudio de portadores fecales de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas (EPCs) reveló un aumento de su proporción desde un 0,7% en 2006 a un 1,5% en 2009-2010. En este segundo período se detectaron por primera vez en nuestra área geográfica EPCs en pacientes ambulatorios. VIM-1 fue la única carbapenemasa encontrada en ambos períodos. Estos resultados alertan de la posibilidad de encontrar portadores de EPCs que de otra manera no hubiesen sido detectados ya que la mayoría de los pacientes no presentaron infección y no habían tenido contacto previo con pacientes colonizados o infectados por este tipo de microorganismos.
2. El estudio de la estructura poblacional de los aislados de 2006 reveló la presencia de los mismos clones de *Klebsiella pneumoniae* (ST39) y *E. cloacae* productores de VIM-1 causantes del brote detectado un año antes en nuestro Hospital. En el período 2009-2010 se constató una mayor diversidad con la aparición de nuevos clones de *K. pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* y la emergencia de VIM-1 en *Escherichia coli* y *Citrobacter freundii*.
3. En los aislados de EPC obtenidos en el estudio de portadores se evidenció la diseminación de plásmidos transmisibles de los grupos IncN y IncHI2 que contenían integrones de clase 1 con el gen *bla*_{VIM-1} similares a los encontrados en el brote acaecido en nuestro hospital en 2005, demostrando su implicación en la persistencia del gen *bla*_{VIM-1}.
4. Entre los aislados clínicos de EPC de tipo VIM recogidos entre 2008 y 2013 en nuestro Hospital, encontramos una mayor proporción de *K. pneumoniae* que de otras especies y una alta diversidad clonal con la disminución de clones anteriormente detectados (ST39) y la emergencia y penetración de clones multirresistentes de alto riesgo con importancia epidemiológica creciente (ST11, ST15 y ST54). Asimismo, encontramos *E. coli*-ST131 con VIM-1, muy ligado a la gran dispersión de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) de tipo CTX-M, alertando del peligro que puede suponer para la dispersión de este tipo de carbapenemasas.
5. La caracterización de los elementos de transmisión horizontal mostró una dispersión de plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad (IncN, IncHI2, IncL/M e IncFIIk) que serían responsables de la diseminación y mantenimiento del gen *bla*_{VIM-1} en una gran variedad de clones de distintas especies conduciendo a su endemidad a lo largo del tiempo.
6. La primera detección de enterobacterias productoras de OXA-48 en nuestro hospital se produjo en 2012 en una situación de endemia por EPC de tipo VIM y de emergencia de EPCs de tipo KPC. Este hecho demuestra la complejidad de la epidemiología de este tipo de microorganismos y la posibilidad de encontrar diferentes tipos de carbapenemasas en una única institución.
7. OXA-48 se encontró mayoritariamente en *K. pneumoniae* y en menor medida en *E. coli* y otras enterobacterias. El estudio de su estructura poblacional reveló la presencia del gen *bla*_{OXA-48} en los clones de alto riesgo a) ST11, previamente asociado en nuestro hospital a CTX-M-15, VIM-1 y KPC-3 y ahora como co-productor de VIM-1 y OXA-48, b) ST405, responsable en su inicio de la epidemia acontecida en el Hospital Universitario La Paz, c) ST-15,

previamente asociado a VIM-1 en nuestro Hospital y responsable de un brote en el Hospital Puerta de Hierro y d) ST307, asociado a la dispersión de enzimas de tipo KPC-3 y más recientemente a la resistencia a ceftazidima-avibactam. Estas observaciones respaldarían la importancia del seguimiento de los clones locales circulantes que pueden contribuir a la difusión y mantenimiento de las bacterias multirresistentes.

8. La aparición de OXA-48 en clones de alto riesgo de *K. pneumoniae*-ST11 en una elevada proporción y también, aunque en menor medida, ST405 en pacientes no hospitalizados destaca las dificultades que podría suponer la prevención de la diseminación de esta carbapenemasa en la comunidad.
9. Al contrario que en *K. pneumoniae*, en los aislados de *E. coli* el gen *bla*_{OXA-48} se encontró en clones escasamente descritos con anterioridad. Este hecho indicaría que la diseminación de OXA-48 podría estar asociada a la diseminación de plásmidos altamente transmisibles y no exclusivamente a la diseminación de clones de alto riesgo como acontece habitualmente con las carbapenemasas de tipo KPC.
10. A diferencia de lo acontecido con los genes *bla*_{VIM-1} localizados en diferentes tipos de plásmidos, *bla*_{OXA-48} se encontró en un único plásmido pRYC-OXA48 del tipo IncI con una estructura similar a la descrita en otros estudios. La secuenciación de este plásmido puso de manifiesto la presencia del gen *bla*_{OXA-48} en el transposón *Tn1999.2* y la coexistencia del gen *bla*_{CTX-M-15} asociado con la secuencia de inserción *ISEcp1*.
11. La comparación de la microdilución en caldo con la microcalorimetría demostró que esta última técnica puede utilizarse para el cálculo de los valores de CMI a los antimicrobianos en *E. coli* y *K. pneumoniae*, pudiendo ser una alternativa de futuro a los métodos convencionales de estudio de la sensibilidad en los microorganismos multirresistentes. También demostramos por vez primera la posible utilidad de la microcalorimetría en la medición del efecto sinérgico de los antimicrobianos en las EPCs.
12. El presente trabajo demuestra la necesidad de realizar estudios microbiológicos y epidemiológicos con una perspectiva temporal de los mecanismos de resistencia presentes en *Enterobacterales* que nos ayuden a ampliar su conocimiento y comprender la dimensión del problema.

BIBLIOGRAFÍA

1. European Centre for Disease Prevention and Control. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). www.ecdc.europa.eu.
2. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
3. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. REGISTRO HOSPITALARIO DE PACIENTES AFECTADOS POR LAS RESISTENCIAS BACTERIANAS. www.seimc.org. https://seimc.org/contenidos/noticias/2018/seimc-Registro_de_Pacientes_BMR.pdf. Published 2018.
4. Sykes R. The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(9):1842-1852. doi:10.1093/jac/dkq217
5. Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(5):477-485. doi:10.1016/j.coph.2011.07.007
6. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):565-591. doi:10.1128/CMR.00116-14
7. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-976. doi:10.1128/AAC.01009-09
8. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-458. doi:10.1128/CMR.00001-07
9. Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32:4-9. doi:10.1016/S0213-005X(14)70168-5
10. Bush K, Bradford PA. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(5):295-306. doi:10.1038/s41579-019-0159-8
11. Naas T, Vandel L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(6):1262-1270. doi:10.1128/aac.38.6.1262
12. Fairfax MR, Queenan AM, Lephart PR, et al. Detection of 2 SME-1 carbapenemase-producing *Serratia marcescens* in Detroit. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71(3):325-326. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.06.007
13. Queenan AM, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J. SME-3, a Novel Member of the *Serratia marcescens* SME Family of Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(10):3485-3487. doi:10.1128/AAC.00363-06
14. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, et al. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(9):2080-2086. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8878585>. Accessed June 16, 2019.
15. Naas T, Cattoen C, Bernusset S, Cuzon G, Nordmann P. First Identification of *bla*_{IMI-1} in an *Enterobacter cloacae* Clinical Isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(3):1664-1665. doi:10.1128/AAC.06328-11
16. Bejuk D, Novkoski M, Juranko V, et al. [A report of rarely observed resistance pattern to carbapenems in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*]. *Lijec Vjesn.* 135(11-12):316-321. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24490332>. Accessed June 16, 2019.
17. Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Finland: the first years (2008-11). *J Antimicrob Chemother.*

- 2012;67(12):2860-2864. doi:10.1093/jac/dks299
18. Radice M, Power P, Gutkind G, et al. First class a carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(3):1068-1069. doi:10.1128/aac.48.3.1068-1069.2004
19. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(2):260-264. doi:10.3201/eid1102.030684
20. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:42-52. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01861.x
21. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(9):2598-2603. doi:10.1128/aac.45.9.2598-2603.2001
22. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(3):561-565. doi:10.1093/jac/49.3.561
23. Ribeiro VB, Zavascki AP, Rozales FP, et al. Detection of *bla*_{GES-5} in Carbapenem-Resistant *Kluyvera intermedia* Isolates Recovered from the Hospital Environment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):622-623. doi:10.1128/AAC.02271-13
24. Ribeiro VB, Falci DR, Rozales FP, Barth AL, Zavascki AP. Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. *Brazilian J Infect Dis*. 2014;18(2):231-232. doi:10.1016/j.bjid.2013.12.002
25. Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar J-R, Poirel L. Carbapenem-Hydrolyzing GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(1):349-354. doi:10.1128/AAC.00773-10
26. Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H, et al. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):396-401. doi:10.1128/AAC.01784-12
27. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):1151-1161. doi:10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001
28. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(9):785-796. doi:10.1016/S1473-3099(13)70190-7
29. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Eurosurveillance*. 2015;20(45):30062. doi:10.2807/1560-7917.ES.2015.20.45.30062
30. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):413-431. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x
31. Giddins MJ, Macesic N, Annavajhala MK, et al. Successive Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance through Distinct Genomic Adaptations in *bla*_{KPC-2}-Harboring *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 307 Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(3). doi:10.1128/AAC.02101-17
32. Shields RK, Chen L, Cheng S, et al. Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Due to Plasmid-Borne *bla*_{KPC-3} Mutations during Treatment of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(3). doi:10.1128/AAC.02097-16
33. Cuzon G, Naas T, Truong H, et al. Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produce β -Lactamase *bla*_{KPC-2} Gene1. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(9):1349-1356.

- doi:10.3201/eid1609.091389
34. Juan Nicolau C, Oliver A. [Carbapenemases in *Pseudomonas* spp]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28 Suppl 1:19-28. doi:10.1016/S0213-005X(10)70004-5
 35. Zhao W-H, Hu Z-Q. Acquired metallo- β -lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. *Future Microbiol*. 2015;10(5):873-887. doi:10.2217/fmb.15.18
 36. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):306-325. doi:10.1128/CMR.18.2.306-325.2005
 37. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular Characterization of a β -Lactamase Gene, *bla*_{GIM-1}, Encoding a New Subclass of Metallo- β -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(12):4654-4661. doi:10.1128/AAC.48.12.4654-4661.2004
 38. Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(11):4194-4197. doi:10.1128/AAC.01337-07
 39. Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, et al. Molecular and Epidemiological Characterization of IMP-Type Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacter cloacae* in a Large Tertiary Care Hospital in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(6):3441-3450. doi:10.1128/AAC.02652-13
 40. Lee C-M, Liao C-H, Lee W-S, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2-Producing *K. pneumoniae* Sequence Type 11 in Taiwan in 2011. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(10):5016-5022. doi:10.1128/AAC.00878-12
 41. Wei Z, Yu T, Qi Y, et al. Coexistence of plasmid-mediated KPC-2 and IMP-4 carbapenemases in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from China. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(11):2670-2671. doi:10.1093/jac/dkr330
 42. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(7):1584-1590. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10390207>. Accessed June 16, 2019.
 43. Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini GM, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis*. 2000;31(5):1119-1125. doi:10.1086/317448
 44. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol*. 2007;2(5):501-512. doi:10.2217/17460913.2.5.501
 45. Jeannot K, Guessennd N, Fournier D, Muller E, Gbonon V, Plesiat P. Outbreak of metallo- β -lactamase VIM-2-positive strains of *Pseudomonas aeruginosa* in the Ivory Coast. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(12):2952-2954. doi:10.1093/jac/dkt296
 46. Jacobson RK, Minenza N, Nicol M, Bamford C. VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* causing an outbreak in South Africa. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(7):1797-1798. doi:10.1093/jac/dks100
 47. Van der Bij AK, Van Mansfeld R, Peirano G, et al. First outbreak of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in The Netherlands: microbiology, epidemiology and clinical outcomes. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37(6):513-518. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.02.010
 48. Kassis-Chikhani N, Decré D, Gautier V, et al. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{VIM-1} and *bla*_{SHV-5} in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(1):142-145. doi:10.1093/jac/dki389
 49. Miriagou V, Douzinas EE, Papagiannitsis CC, Piperaki E, Legakis NJ, Tzouveleakis LS. Emergence of *Serratia liquefaciens* and *Klebsiella oxytoca* with metallo- β -lactamase-encoding IncW plasmids: further spread of the *bla*_{VIM-1}-carrying integron In-e541. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32(6):540-541. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.06.022

50. Psychogiou M, Tassios PT, Avlami A, et al. Ongoing epidemic of *bla*_{VIM-1}-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother.* 2007;61(1):59-63. doi:10.1093/jac/dkm443
51. Rieber H, Frontzek A, Pfeifer Y. Emergence of Metallo- β -Lactamase GIM-1 in a Clinical Isolate of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(9):4945-4947. doi:10.1128/AAC.00405-12
52. Hamprecht A, Poirel L, Gottig S, Seifert H, Kaase M, Nordmann P. Detection of the carbapenemase GIM-1 in *Enterobacter cloacae* in Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(3):558-561. doi:10.1093/jac/dks447
53. Kaase M, Szabados F, Pfennigwerth N, et al. Description of the metallo- β -lactamase GIM-1 in *Acinetobacter pittii*. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(1):81-84. doi:10.1093/jac/dkt325
54. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50(5):673-679. doi:10.1093/jac/dkf210
55. Lee K, Yum JH, Yong D, et al. Novel Acquired Metallo- β -Lactamase Gene, *bla*_{SIM-1}, in a Class 1 Integron from *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(11):4485-4491. doi:10.1128/AAC.49.11.4485-4491.2005
56. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P. Characterization of DIM-1, an Integron-Encoded Metallo- β -Lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* Clinical Isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(6):2420-2424. doi:10.1128/AAC.01456-09
57. El Salabi A, Borra PS, Toleman MA, Samuelsen Ø, Walsh TR. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo- β -lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2241-2245. doi:10.1128/AAC.05640-11
58. Yong D, Toleman MA, Bell J, et al. Genetic and Biochemical Characterization of an Acquired Subgroup B3 Metallo- β -Lactamase Gene, *bla*_{AIM-1}, and Its Unique Genetic Context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(12):6154-6159. doi:10.1128/AAC.05654-11
59. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, *bla*_{NDM-1}, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5046-5054. doi:10.1128/AAC.00774-09
60. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011;19(12):588-595. doi:10.1016/j.tim.2011.09.005
61. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(5):355-362. doi:10.1016/S1473-3099(11)70059-7
62. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(9):597-602. doi:10.1016/S1473-3099(10)70143-2
63. Halaby T, Reuland AE, Al Naiemi N, et al. A case of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* with putative secondary transmission from the Balkan region in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2790-2791. doi:10.1128/AAC.00111-12
64. Zowawi HM, Balkhy HH, Walsh TR, Paterson DL. β -Lactamase Production in Key Gram-Negative Pathogen Isolates from the Arabian Peninsula. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(3):361-380. doi:10.1128/CMR.00096-12

65. Jamal W, Rotimi VO, Albert MJ, Khodakhast F, Udo EE, Poirel L. Emergence of nosocomial New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients admitted to a tertiary care hospital in Kuwait. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(2):183-184. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.10.002
66. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-12. doi:10.1155/2014/249856
67. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence*. 2017;8(4):460-469. doi:10.1080/21505594.2016.1222343
68. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):24-38. doi:10.1128/AAC.01512-08
69. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1791-1798. doi:10.3201/eid1710.110655
70. Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(9):4398-4401. doi:10.1128/AAC.00329-11
71. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(7):1597-1606. doi:10.1093/jac/dks121
72. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):15-22. doi:10.1128/aac.48.1.15-22.2004
73. Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E, et al. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(4):2125-2128. doi:10.1128/AAC.05315-11
74. Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(12):E24-E26. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03669.x
75. Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME, et al. Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae* in the Netherlands, 2009 to 2011. *Euro Surveill*. 2014;19(9). doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.9.20723
76. Thomas CP, Moore LSP, Elamin N, et al. Early (2008–2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42(6):531-536. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.08.020
77. Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N. Characterization of *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(7):1660-1665. doi:10.1093/jac/dks124
78. Potron A, Schrenzel J, Poirel L, Renzi G, Cherkaoui A, Nordmann P. Emergence of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(6):563-564. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.07.003
79. Navarro-San Francisco C, Mora-Rillo M, Romero-Gómez MP, et al. Bacteraemia due to OXA-48-carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a major clinical challenge. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(2):E72-9. doi:10.1111/1469-0691.12091
80. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):559-562. doi:10.1128/AAC.05289-11
81. Matar GM, Cuzon G, Araj GF, et al. Oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Lebanon. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(9):887-888. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02059.x
82. Dortet L, Poirel L, Al Yaqoubi F, Nordmann P. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Sultanate of Oman. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):E144-E148. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03796.x

83. Al-Agamy MH, Shibl AM, Elkhizzi NA, Meunier D, Turton JF, Livermore DM. Persistence of *Klebsiella pneumoniae* clones with OXA-48 or NDM carbapenemases causing bacteraemias in a Riyadh hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76(2):214-216. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.006
84. Shibl A, Al-Agamy M, Memish Z, Senok A, Khader SA, Assiri A. The emergence of OXA-48- and NDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *Int J Infect Dis.* 2013;17(12):e1130-e1133. doi:10.1016/j.ijid.2013.06.016
85. Zowawi HM, Sartor AL, Balkhy HH, et al. Molecular Characterization of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the Countries of the Gulf Cooperation Council: Dominance of OXA-48 and NDM Producers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(6):3085-3090. doi:10.1128/AAC.02050-13
86. Poirel L, Carbone E, Bernabeu S, Gutmann L, Rotimi V, Nordmann P. Importation of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* from Kuwait. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(8):2051-2052. doi:10.1093/jac/dks167
87. Brink AJ, Coetzer J, Corcoran C, et al. Emergence of OXA-48 and OXA-181 Carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in South Africa and Evidence of *In Vivo* Selection of Colistin Resistance as a Consequence of Selective Decontamination of the Gastrointestinal Tract. *J Clin Microbiol.* 2013;51(1):369-372. doi:10.1128/JCM.02234-12
88. Moquet O, Bouchiat C, Kinana A, et al. Class D OXA-48 Carbapenemase in Multidrug-Resistant Enterobacteria, Senegal. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(1):143-144. doi:10.3201/eid1701.100244
89. Potron A, Nordmann P, Lefeuvre E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. Characterization of OXA-181, a Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4896-4899. doi:10.1128/AAC.00481-11
90. Samuelsen O, Naseer U, Karah N, et al. Identification of *Enterobacteriaceae* isolates with OXA-48 and coproduction of OXA-181 and NDM-1 in Norway. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(7):1682-1685. doi:10.1093/jac/dkt058
91. Potron A, Nordmann P, Poirel L. Characterization of OXA-204, a Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):633-636. doi:10.1128/AAC.01034-12
92. Doi Y, O'Hara JA, Lando JF, et al. Co-Production of NDM-1 and OXA-232 by *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(1):163-165. doi:10.3201/eid2001.130904
93. Poirel L, Castanheira M, Carrère A, et al. OXA-163, an OXA-48-Related Class D β -Lactamase with Extended Activity Toward Expanded-Spectrum Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2546-2551. doi:10.1128/AAC.00022-11
94. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):413-431. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x
95. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Campos J. Extended-spectrum [beta]-lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23(4):320-326. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20614578>. Accessed June 16, 2019.
96. Ashiru-Oredope D, Sharland M, Charani E, McNulty C, Cooke J, ARHAI Antimicrobial Stewardship Group. Improving the quality of antibiotic prescribing in the NHS by developing a new Antimicrobial Stewardship Programme: Start Smart--Then Focus. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(suppl 1):i51-i63. doi:10.1093/jac/dks202
97. Meyer E, Gastmeier P, Deja M, Schwab F. Antibiotic consumption and resistance: Data from Europe and Germany. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6-7):388-395. doi:10.1016/j.ijmm.2013.04.004
98. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing

- Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(2):153-163. doi:10.1016/S1473-3099(16)30257-2
99. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(2):112-122. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03116.x
 100. Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol*. 2013;4:48. doi:10.3389/fmicb.2013.00048
 101. Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other *Enterobacteriaceae*: an Evolving Crisis of Global Dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(4):682-707. doi:10.1128/CMR.05035-11
 102. Bradford PA, Bratu S, Urban C, et al. Emergence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella* Species Possessing the Class A Carbapenem-Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-Resistant TEM-30 - Lactamases in New York City. *Clin Infect Dis*. 2004;39(1):55-60. doi:10.1086/421495
 103. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(6):1257-1260. doi:10.1093/jac/dkn364
 104. Glasner C, Albiger B, Buist G, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill*. 2013;18(28). doi:10.2807/1560-7917.es2013.18.28.20525
 105. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, et al. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(7):1510-1513. doi:10.1093/jac/dkr166
 106. Giani T, D'Andrea MM, Pecile P, et al. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 Producing KPC-3 Carbapenemase. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3793-3794. doi:10.1128/JCM.01773-09
 107. Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, et al. Containment of an Outbreak of KPC-3-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *J Clin Microbiol*. 2011;49(11):3986-3989. doi:10.1128/JCM.01242-11
 108. Baraniak A, Izdebski R, Herda M, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(10):4565-4567. doi:10.1128/AAC.00436-09
 109. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35(5):736-755. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x
 110. Samuelsen O, Buaro L, Toleman MA, et al. The First Metallo-β-Lactamase Identified in Norway Is Associated with a TnIC-Like Transposon in a *Pseudomonas aeruginosa* Isolate of Sequence Type 233 Imported from Ghana. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(1):331-332. doi:10.1128/AAC.00785-08
 111. Woodford N, Zhang J, Warner M, et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(6):1261-1264. doi:10.1093/jac/dkn396
 112. Tóth Á, Damjanova I, Puskás E, et al. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(7):765-769. doi:10.1007/s10096-010-0921-3
 113. Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, et al. Emergence of bla_{KPC-3}-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(8):1608-1614. doi:10.1093/jac/dkq174
 114. Jeong SH, Bae IK, Kim D, et al. First Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Producing GES-5 and SHV-12 Extended-Spectrum β-Lactamases in Korea. *Antimicrob Agents*

- Chemother.* 2005;49(11):4809-4810. doi:10.1128/AAC.49.11.4809-4810.2005
115. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the Metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{IMP-4} among Gram-Negative Pathogens in a Clinical Setting in Australia. *Clin Infect Dis.* 2005;41(11):1549-1556. doi:10.1086/497831
 116. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(7):695-696. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01480.x
 117. Ma L, Lu P-L, Siu LK, Hsieh M-H. Molecular typing and resistance mechanisms of imipenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: results from the Taiwan surveillance of antibiotic resistance (TSAR) study, 2002-2009. *J Med Microbiol.* 2013;62(Pt_1):101-107. doi:10.1099/jmm.0.050492-0
 118. Pournaras S, Köck R, Mossialos D, et al. Detection of a phylogenetically distinct IMP-type metallo- β -lactamase, IMP-35, in a CC235 *Pseudomonas aeruginosa* from the Dutch-German border region (Euregio). *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(6):1271-1276. doi:10.1093/jac/dkt004
 119. Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Vatopoulos AC, Giakkoupi P, Maâtallah M, Giske CG. Dissemination of *bla*_{VIM} in Greece at the peak of the epidemic of 2005–2006: clonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 147. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(1):34-37. doi:10.1111/1469-0691.12187
 120. Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, Santos O'Connor F, Giesecke J, the European NDM-Survey Participan C. New Delhi metallo-beta-lactamase 1–producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. *Eurosurveillance.* 2010;15(46). doi:10.2807/ese.15.46.19716-en
 121. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(4):689-692. doi:10.1093/jac/dkq520
 122. Espinal P, Mosqueda N, Telli M, et al. Identification of NDM-1 in a Putatively Novel *Acinetobacter* Species (“NB14”) Closely Related to *Acinetobacter pittii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):6657-6660. doi:10.1128/AAC.01455-15
 123. Seara N, Oteo J, Carrillo R, et al. Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(2):169-173. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.04.001
 124. Mushtaq S, Irfan S, Sarma JB, et al. Phylogenetic diversity of *Escherichia coli* strains producing NDM-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(9):2002-2005. doi:10.1093/jac/dkr226
 125. Peirano G, Schreckenberger PC, Pitout JDD. Characteristics of NDM-1-Producing *Escherichia coli* Isolates That Belong to the Successful and Virulent Clone ST131. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2986-2988. doi:10.1128/AAC.01763-10
 126. Woodford N, Johnson AP. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol.* 2013;62(4):499-513. doi:10.1099/jmm.0.052555-0
 127. Cuzon G, Naas T, Lesenne A, Benhamou M, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(1):91-93. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.02.014
 128. Castanheira M, Deshpande LM, Mendes RE, Canton R, Sader HS, Jones RN. Variations in the Occurrence of Resistance Phenotypes and Carbapenemase Genes Among *Enterobacteriaceae* Isolates in 20 Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(Supplement_1):S23-S33. doi:10.1093/ofid/ofy347
 129. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JDD. Surveillance and Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Isolates That Produce Carbapenemases: First Report

- of OXA-48-Like Enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):130-136. doi:10.1128/AAC.01686-12
130. Oteo J, Miró E, Pérez-Vázquez M, Navarro F. Evolution of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at the global and national level: What should be expected in the future? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32:17-23. doi:10.1016/S0213-005X(14)70170-3
 131. Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(5):466-475. doi:10.1016/j.mib.2006.08.011
 132. Carattoli A. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2227-2238. doi:10.1128/AAC.01707-08
 133. Coque TM, Novais A, Carattoli A, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(2):195-200. doi:10.3201/eid1402.070350
 134. Marcadé G, Deschamps C, Boyd A, et al. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(1):67-71. doi:10.1093/jac/dkn428
 135. Novais A, Cantón R, Moreira R, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(2):796-799. doi:10.1128/AAC.01070-06
 136. Dunn SJ, Connor C, McNally A. The evolution and transmission of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: the complexity of clones and plasmids. *Curr Opin Microbiol.* 2019;51:51-56. doi:10.1016/j.mib.2019.06.004
 137. Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D. The Integron: Adaptation On Demand. In: *Mobile DNA III*. Vol 3. American Society of Microbiology; 2015:139-161. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014
 138. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. A Distinctive Class of Integron in the *Vibrio cholerae* Genome. *Science (80-)*. 1998;280(5363):605-608. doi:10.1126/science.280.5363.605
 139. Cambray, G, Guerout, A-M, Mazel D. Integrons. *Annu Rev Genet.* 2010;44(1):141-166. doi:10.1146/annurev-genet-102209-163504
 140. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol.* 2007;15(7):301-309. doi:10.1016/j.tim.2007.05.004
 141. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(8):608-620. doi:10.1038/nrmicro1462
 142. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33(4):757-784. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x
 143. MacDonald D, Demarre G, Bouvier M, Mazel D, Gopaul DN. Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination. *Nature.* 2006;440(7088):1157-1162. doi:10.1038/nature04643
 144. Wyres KL, Hawkey J, Hetland MAK, et al. Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(3):577-581. doi:10.1093/jac/dky492
 145. Baquero F, Tedim AP, Coque TM. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Front Microbiol.* 2013;4:15. doi:10.3389/fmicb.2013.00015
 146. Riley LW. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(5):380-390. doi:10.1111/1469-0691.12646
 147. Esteban-Cantos A, Aracil B, Bautista V, et al. The Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Population Is Distinct and More Clonal than the Carbapenem-Susceptible Population. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(4). doi:10.1128/AAC.02520-16

148. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Bautista V, et al. The spread of KPC-producing *Enterobacteriaceae* in Spain: WGS analysis of the emerging high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* ST11/KPC-2, ST101/KPC-2 and ST512/KPC-3. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(12):3392-3399. doi:10.1093/jac/dkw321
149. del Barrio-Tofiño E, Zamorano L, Cortes-Lara S, et al. Spanish nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* April 2019. doi:10.1093/jac/dkz147
150. Lam MMC, Wyres KL, Wick RR, et al. Convergence of virulence and MDR in a single plasmid vector in MDR *Klebsiella pneumoniae* ST15. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(5):1218-1222. doi:10.1093/jac/dkz028
151. Vargas JM, Moreno Mochi MP, Nuñez JM, et al. Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon.* 2019;5(6):e01829. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01829
152. Yamamoto T, Takano T, Iwao Y, Hishinuma A. Emergence of NDM-1-positive capsulated *Escherichia coli* with high resistance to serum killing in Japan. *J Infect Chemother.* 2011;17(3):435-439. doi:10.1007/s10156-011-0232-3
153. Zhang Y, Liao K, Gao H, et al. Decreased Fitness and Virulence in ST10 *Escherichia coli* Harboring blaNDM-5 and mcr-1 against a ST4981 Strain with blaNDM-5. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:242. doi:10.3389/fcimb.2017.00242
154. Kontopidou F, Giamarellou H, Katerelos P, et al. Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among patients in intensive care units in Greece: a multi-centre study on clinical outcome and therapeutic options. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(2):O117-O123. doi:10.1111/1469-0691.12341
155. Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. Therapeutic options for infections with *Enterobacteriaceae* producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol.* 2011;6(6):653-666. doi:10.2217/fmb.11.49
156. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(5):415-419. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.01.012
157. Berçot B, Poirel L, Nordmann P. Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71(4):442-445. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.016
158. Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med.* 2015;277(5):501-512. doi:10.1111/joim.12342
159. Rhomberg PR, Jones RN. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999–2008). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;65(4):414-426. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.08.020
160. Diekema DJ, Hsueh P-R, Mendes RE, et al. The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* April 2019. doi:10.1128/AAC.00355-19
161. Tórtola MT, Lavilla S, Miró E, et al. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two enterobacteriaceae isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(8):3492-3494. doi:10.1128/AAC.49.8.3492-3494.2005
162. Tato M, Coque TM, Rucz-Garbajosa P, et al. Complex Clonal and Plasmid Epidemiology in the First Outbreak of *Enterobacteriaceae* Infection Involving VIM-1 Metallo- β -Lactamase in Spain: Toward Endemicity? *Clin Infect Dis.* 2007;45(9):1171-1178. doi:10.1086/522288
163. Sánchez-Romero I, Asensio Á, Oteo J, et al. Nosocomial Outbreak of VIM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Multilocus Sequence Type 15: Molecular Basis, Clinical Risk

- Factors, and Outcome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(1):420-427. doi:10.1128/AAC.05036-11
164. Cendejas E, Gómez-Gil R, Gómez-Sánchez P, Mingorance J. Detection and characterization of *Enterobacteriaceae* producing metallo-beta-lactamases in a tertiary-care hospital in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(2):181-183. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02888.x
 165. Oteo J, Hernández-Almaraz JL, Gil-Antón J, et al. OUTBREAK OF VIM-1-CARBAPENEMASE-PRODUCING *ENTEROBACTER CLOACAE* IN A PEDIATRIC INTENSIVE CARE UNIT. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(12):1144-1146. doi:10.1097/INF.0b013e3181efaa2d
 166. Pérez-Llarena FJ, Fernández A, Zamorano L, et al. Characterization of a Novel IMP-28 Metallo- β -Lactamase from a Spanish *Klebsiella oxytoca* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(8):4540-4543. doi:10.1128/AAC.00776-12
 167. Solé M, Pitart C, Roca I, et al. First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4402-4404. doi:10.1128/AAC.00642-11
 168. Miró E, Agüero J, Larrosa MN, et al. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC β -lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(2):253-259. doi:10.1007/s10096-012-1737-0
 169. Conejo MC, Domínguez MC, López-Cerero L, Serrano L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Isolation of multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* carrying *bla*_{IMP-8}, associated with OXY hyperproduction, in the intensive care unit of a community hospital in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(5):1071-1073. doi:10.1093/jac/dkq063
 170. Oteo J, Saez D, Bautista V, et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(12):6344-6347. doi:10.1128/AAC.01513-13
 171. Oteo J, Domingo-García D, Fernández-Romero S, et al. Abdominal abscess due to NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt_6):864-867. doi:10.1099/jmm.0.043190-0
 172. Gil-Romero Y, Sanz-Rodríguez N, Almagro-Moltó M, Gómez-Garcés JL. [New description of a NDM-1 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* carrier in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(6):418-419. doi:10.1016/j.eimc.2012.10.009
 173. Hernández-García M, Pérez-Viso B, Carmen Turrientes M, et al. Characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from colonized patients in a university hospital in Madrid, Spain, during the R-GNOSIS project depicts increased clonal diversity over time with maintenance of high-risk clones. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(11):3039-3043. doi:10.1093/jac/dky284
 174. Hernández-García M, Pérez-Viso B, León-Sampedro R, et al. Outbreak of NDM-1-CTX-M-15-DHA-1 producing *Klebsiella pneumoniae* high-risk clone in Spain due to an undetectable colonized patient from Pakistan. *Int J Antimicrob Agents.* June 2019. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.05.021
 175. Gomez-Gil MR, Pano-Pardo JR, Romero-Gomez MP, et al. Detection of KPC-2-producing *Citrobacter freundii* isolates in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(12):2695-2697. doi:10.1093/jac/dkq352
 176. Valentín-Martín A, Valverde-De Francisco A, Bosque-Vall M, Cantón-Moreno R. First report of colistin-resistant KPC-2 producing ST258-*Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(7):489-491. doi:10.1016/j.eimc.2012.12.002
 177. López-Cerero L, Egea P, Gracia-Ahufinger I, et al. Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST512) in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(6):538-540. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.08.006
 178. Hernández-García M, Sánchez-López J PM, Morosini MI CR y RP. EMERGENCIA DE UNA NUEVA VARIANTE DE KPC-3 TRAS LA EXPOSICIÓN A CEFTAZIDIMA/AVIBACTAM EN EL CLON DE ALTO RIESGO ST307-K. *PNEUMONIAE EN UN HOSPITAL TERCIARIO (MADRID)*. Madrid;

2019. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-X0213005X1963759X>.
179. Oteo J, Hernandez JM, Espasa M, et al. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(2):317-321. doi:10.1093/jac/dks383
180. Machuca J, López-Cerero L, Fernández-Cuenca F, et al. OXA-48-Like-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Spain in 2014–2015. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;63(1). doi:10.1128/AAC.01396-18
181. Díaz-Agero Pérez C, López-Fresneña N, Rincon Carlavilla AL, et al. Local prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* intestinal carriers at admission and co-expression of ESBL and OXA-48 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*: a prevalence survey in a Spanish University Hospital. *BMJ Open*. 2019;9(3):e024879. doi:10.1136/bmjopen-2018-024879
182. Miró E, Agüero J, Larrosa MN, et al. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC β -lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(2):253-259. doi:10.1007/s10096-012-1737-0
183. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, et al. Prospective Multicenter Study of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* from 83 Hospitals in Spain Reveals High *In Vitro* Susceptibility to Colistin and Meropenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3406-3412. doi:10.1128/AAC.00086-15
184. Miller S, Humphries RM. Clinical laboratory detection of carbapenem-resistant and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;14(8):705-717. doi:10.1080/14787210.2016.1206815
185. Matsumura Y, Pitout JD. Recent advances in the laboratory detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(7):783-794. doi:10.1586/14737159.2016.1172964
186. Aguirre-Quiñonero A, Martínez-Martínez L. Non-molecular detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Infect Chemother*. 2017;23(1):1-11. doi:10.1016/j.jiac.2016.09.008
187. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. Kraft CS, ed. *J Clin Microbiol*. 2018;56(11). doi:10.1128/JCM.01140-18
188. Silva AP, Faria-Ramos I, Ricardo E, et al. Rapid Flow Cytometry Test for Identification of Different Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(6):3824-3826. doi:10.1128/AAC.02947-15
189. Entenza JM, Betrisey B, Manuel O, et al. Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* Strains with Reduced Susceptibility to Vancomycin by Isothermal Microcalorimetry. *J Clin Microbiol*. 2014;52(1):180-186. doi:10.1128/JCM.01820-13
190. Braissant O, Wirz D, GÄpfert B, Daniels AU. Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;303(1):1-8. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01819.x
191. Jansson M. LabelFree CellBased assays and the holistic calorimetry approach. *Am Lab*. 2014;46(9):24-26.
192. Lewis G, (Dan) Daniels AU. Use of isothermal heat-conduction microcalorimetry (IHCMC) for the evaluation of synthetic biomaterials. *J Biomed Mater Res*. 2003;66B(2):487-501. doi:10.1002/jbm.b.10044
193. Trampuz A, Salzmann S, Antheaume J, Daniels AU. Microcalorimetry: a novel method for detection of microbial contamination in platelet products. *Transfusion*. 2007;47(9):1643-1650. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01336.x
194. von Ah U, Wirz D, Daniels AU. Isothermal micro calorimetry--a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *E. coli* and *S. aureus*. *BMC*

- Microbiol.* 2009;9(1):106. doi:10.1186/1471-2180-9-106
195. Xi L, Yi L, Jun W HL& SQ. Microcalorimetric study of *Staphylococcus aureus* growth affected by selenium compounds. *Thermochim Acta.* 2002;387:57-61. doi:10.1016/S0040-6031(01)00825-5
 196. N. Yang, L & Xu, Fangqian & Sun, Li-Xian & B. Zhao, Z & G. Song C. Microcalorimetric studies on the action of different cephalosporins. *J Therm Anal Calorim.* 2008;93:417-421. doi:10.1007/s10973-007-8680-9
 197. Tan AM, Lu JH. Microcalorimetric study of antiviral effect of drug. *J Biochem Biophys Methods.* 1999;38(3):225-228. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10100954>. Accessed June 19, 2019.
 198. Heng Z, Congyi Z, Cunxin W, Jibin W, Chaojiang G JL& yuwen L. Microcalorimetric study of virus infection: The effects of hyperthermia and a 1 b recombinant homo interferon on the infection process of BHK-21 cells by foot and mouth disease virus. *J Therm Anal Calorim.* 2005;79:45-50. doi:https://doi.org/10.1007/s10973-004-0560-y
 199. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(7):524-534. doi:10.1016/j.eimc.2011.03.011
 200. Giske C, Martinez-Martinez L, Cantón R, Stefani S, Skov R, Glupczynsky Y, Nordmann P, Wootton M, Miriagou V, Skov Simonsen G, Zemlickova H, Cohen-Stuart J GM. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. www.eucast.org. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf. Published 2013.
 201. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1503-1507. doi:10.3201/eid1809.120355
 202. Wayne P. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing. 20th Informational Supplement. CLSI document M100-S20. *CLSI.* 2010.
 203. Bimboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7(6):1513-1523. doi:10.1093/nar/7.6.1513
 204. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A General Method for Detecting and Sizing Large Plasmids. *Anal Biochem.* 1995;226(2):235-240. doi:10.1006/abio.1995.1220
 205. Tato M, Coque TM, Baquero F, Canton R. Dispersal of Carbapenemase *bla*_{VIM-1} Gene Associated with Different Tn402 Variants, Mercury Transposons, and Conjugative Plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):320-327. doi:10.1128/AAC.00783-09
 206. Monstein H-J, Ostholm-Balkhed A, Nilsson M V, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS.* 2007;115(12):1400-1408. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x
 207. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(1):154-155. doi:10.1093/jac/dki412
 208. Rasheed JK, Jay C, Metchock B, et al. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(3):647-653. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9056008>. Accessed July 31, 2019.
 209. Olesen I, Hasman H, Møller Aarestrup F. Prevalence of β -Lactamases among Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* Isolated from Food Animals in Denmark. *Microb Drug Resist.* 2004;10(4):334-340. doi:10.1089/mdr.2004.10.334
 210. Carattoli A, Garcia-Fernandez A, Varesi P, et al. Molecular Epidemiology of *Escherichia coli*

- Producing Extended-Spectrum β -Lactamases Isolated in Rome, Italy. *J Clin Microbiol*. 2008;46(1):103-108. doi:10.1128/JCM.01542-07
211. Wang H, Kelkar S, Wu W, Chen M, Quinn JP. Clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases: prevalence of CTX-M-3 at a hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(2):790-793. doi:10.1128/aac.47.2.790-793.2003
 212. Paauw A, Verhoef J, Fluit AC, et al. Failure to control an outbreak of qnrA1-positive multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* infection despite adequate implementation of recommended infection control measures. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1420-1425. doi:10.1128/JCM.02242-06
 213. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(1):119-123. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002
 214. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8(6):321-331. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084099>. Accessed July 31, 2019.
 215. Poirel L, H  ritier C, Tol  n V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):15-22. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=310167&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 22, 2015.
 216. Novais A, Canton R, Valverde A, et al. Dissemination and Persistence of *bla*_{CTX-M-9} Are Linked to Class 1 Integrons Containing CR1 Associated with Defective Transposon Derivatives from Tn402 Located in Early Antibiotic Resistance Plasmids of IncHI2, IncP1-, and IncFI Groups. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2741-2750. doi:10.1128/AAC.00274-06
 217. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 2005;63(3):219-228. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018
 218. Compain F, Poisson A, Le Hello S, et al. Targeting relaxase genes for classification of the predominant plasmids in *Enterobacteriaceae*. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(3-4):236-242. doi:10.1016/j.ijmm.2013.09.009
 219. Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(12):2518-2529. doi:10.1093/jac/dkq347
 220. Hernández-García M, Pérez-Viso B, Carmen Turrientes M, et al. Characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from colonized patients in a university hospital in Madrid, Spain, during the R-GNOSIS project depicts increased clonal diversity over time with maintenance of high-risk clones. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(11):3039-3043. doi:10.1093/jac/dky284
 221. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Bautista V, et al. The spread of KPC-producing *Enterobacteriaceae* in Spain: WGS analysis of the emerging high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* ST11/KPC-2, ST101/KPC-2 and ST512/KPC-3. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(12):3392-3399. doi:10.1093/jac/dkw321
 222. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455-477. doi:10.1089/cmb.2012.0021
 223. Chin C-S, Alexander DH, Marks P, et al. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods*. 2013;10(6):563-569. doi:10.1038/nmeth.2474
 224. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075. doi:10.1093/bioinformatics/btt086
 225. Zerbino DR, Birney E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn

- graphs. *Genome Res.* 2008;18(5):821-829. doi:10.1101/gr.074492.107
226. Nurk S, Bankevich A, Antipov D, et al. Assembling Single-Cell Genomes and Mini-Metagenomes From Chimeric MDA Products. *J Comput Biol.* 2013;20(10):714-737. doi:10.1089/cmb.2013.0084
 227. Alikhan N-F, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics.* 2011;12:402. doi:10.1186/1471-2164-12-402
 228. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med.* 1998;15:33-50. doi:10.1385/0-89603-498-4:33
 229. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233-2239. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=228385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed November 21, 2014.
 230. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4178-4182. doi:10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005
 231. Wirth T, Falush D, Lan R, et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* 2006;60(5):1136-1151. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x
 232. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet (London, England).* 1986;1(8476):307-310. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2868172>. Accessed July 22, 2019.
 233. Tato M, Morosini M, García L, Alberti S, Coque MT, Cantón R. Carbapenem Heteroresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging to the same clone: consequences for routine susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 2010;48(11):4089-4093. doi:10.1128/JCM.01130-10
 234. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(1):559-562. doi:10.1128/AAC.05289-11
 235. Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, et al. Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1369-1373. doi:10.1128/AAC.01312-09
 236. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318-327. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3
 237. French CE, Coope C, Conway L, et al. Control of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* outbreaks in acute settings: an evidence review. *J Hosp Infect.* 2017;95(1):3-45. doi:10.1016/j.jhin.2016.10.006
 238. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, et al. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Eurosurveillance.* 2010;15(46). doi:10.2807/ese.15.46.19711-en
 239. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis.* 2017;215(suppl_1):S28-S36. doi:10.1093/infdis/jiw282
 240. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, et al. Prospective Multicenter Study of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* from 83 Hospitals in Spain Reveals High *In Vitro* Susceptibility to Colistin and Meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3406-3412. doi:10.1128/AAC.00086-15
 241. Villa J, Arana DM, Viedma E, Perez-Montarelo D, Chaves F. Characterization of mobile genetic elements carrying VIM-1 and KPC-2 carbapenemases in *Citrobacter freundii* isolates in Madrid. *Int J Med Microbiol.* 2017;307(6):340-345. doi:10.1016/j.ijmm.2017.07.001

242. Pérez-Vazquez M, Oteo-Iglesias J, Sola-Campoy PJ, et al. Characterization of Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca* in Spain, 2016–2017. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(6). doi:10.1128/AAC.02529-18
243. García-Castillo M, García-Fernández S, Gómez-Gil R, et al. Activity of ceftazidime-avibactam against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from urine specimens obtained during the infection-carbapenem resistance evaluation surveillance trial (iCREST) in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51(3):511-515. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.01.011
244. Zhang L, Zhai W, Lin Q, et al. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in hematological patients: outcome of patients with Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infection and risk factors for progression to infection after rectal colonization. *Int J Antimicrob Agents*. July 2019. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.06.023
245. Valverde A, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, Rollan A, Baquero F, Canton R. Dramatic Increase in Prevalence of Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* during Nonoutbreak Situations in Spain. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4769-4775. doi:10.1128/JCM.42.10.4769-4775.2004
246. Paniagua R, Valverde A, Coque TM, Baquero F, Cantón R. Assessment of prevalence and changing epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* fecal carriers using a chromogenic medium. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;67(4):376-379. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.03.012
247. Vidal-Navarro L, Pfeiffer C, Bouziges N, Sotto A, Lavigne J-P. Faecal carriage of multidrug-resistant Gram-negative bacilli during a non-outbreak situation in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(11):2455-2458. doi:10.1093/jac/dkq333
248. Abdallah HM, Alnaemi N, Reuland EA, et al. Fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Egyptian patients with community-onset gastrointestinal complaints: a hospital -based cross-sectional study. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6(1):62. doi:10.1186/s13756-017-0219-7
249. Girlich D, Bouihat N, Poirel L, Benouda A, Nordmann P. High rate of faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at a University hospital in Morocco. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(4):350-354. doi:10.1111/1469-0691.12325
250. Day KM, Ali S, Mirza IA, et al. Prevalence and molecular characterization of *Enterobacteriaceae* producing NDM-1 carbapenemase at a military hospital in Pakistan and evaluation of two chromogenic media. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;75(2):187-191. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.006
251. Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, et al. Influx of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* into the Hospital. *Clin Infect Dis*. 2006;42(7):925-934. doi:10.1086/500936
252. Schwaber MJ, Lev B, Israeli A, et al. Containment of a Country-wide Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli Hospitals via a Nationally Implemented Intervention. *Clin Infect Dis*. 2011;52(7):848-855. doi:10.1093/cid/cir025
253. Schwaber MJ, Carmeli Y. An Ongoing National Intervention to Contain the Spread of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis*. 2014;58(5):697-703. doi:10.1093/cid/cit795
254. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009;58(10):256-260. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19300408>. Accessed August 15, 2019.
255. Adler A, Navon-Venezia S, Moran-Gilad J, Marcos E, Schwartz D, Carmeli Y. Laboratory and clinical evaluation of screening agar plates for detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol*. 2011;49(6):2239-2242.

- doi:10.1128/JCM.02566-10
256. Carrer A, Fortineau N, Nordmann P. Use of ChromID Extended-Spectrum β -Lactamase Medium for Detecting Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1913-1914. doi:10.1128/JCM.02277-09
 257. Bou G, Vila J, Seral C, Javier Castillo F. Detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in various scenarios and health settings. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32:24-32. doi:10.1016/S0213-005X(14)70171-5
 258. Landman D, Salvani JK, Bratu S, Quale J. Evaluation of Techniques for Detection of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Stool Surveillance Cultures. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5639-5641. doi:10.1128/JCM.43.11.5639-5641.2005
 259. Wise MG, Horvath E, Young K, Sahm DF, Kazmierczak KM. Global survey of *Klebsiella pneumoniae* major porins from ertapenem non-susceptible isolates lacking carbapenemases. *J Med Microbiol*. 2018;67(3):289-295. doi:10.1099/jmm.0.000691
 260. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35(5):736-755. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x
 261. Turton JF, Payne Z, Coward A, et al. Virulence genes in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from the UK during 2016, including among carbapenemase gene-positive hypervirulent K1-ST23 and 'non-hypervirulent' types ST147, ST15 and ST383. *J Med Microbiol*. 2018;67(1):118-128. doi:10.1099/jmm.0.000653
 262. Sánchez-López J, García-Caballero A, Navarro-San Francisco C, et al. Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: A challenge in community acquired infection. *IDCases*. 2019;17:e00547. doi:10.1016/j.idcr.2019.e00547
 263. Samuelsen Ø, Toleman MA, Hasseltvedt V, et al. Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(12):1811-1816. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03532.x
 264. Zagorianou A, Sianou E, Iosifidis E, et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *Euro Surveill*. 2012;17(7). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22370015>. Accessed September 1, 2019.
 265. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):664-689. doi:10.1128/CMR.00016-09
 266. Miro E, Segura C, Navarro F, et al. Spread of plasmids containing the blaVIM-1 and blaCTX-M genes and the qnr determinant in *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(4):661-665. doi:10.1093/jac/dkp504
 267. Matsumura Y, Peirano G, Bradford PA, Motyl MR, DeVinney R, Pitout JDD. Genomic characterization of IMP and VIM carbapenemase-encoding transferable plasmids of *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(11):3034-3038. doi:10.1093/jac/dky303
 268. Tato M, Coque TM, Ruíz-Garbajosa P, et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis*. 2007;45(9):1171-1178. doi:10.1086/522288
 269. García-Fernández A, Villa L, Moodley A, et al. Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(9):1987-1991. doi:10.1093/jac/dkr225
 270. Mathers AJ, Cox HL, Kitchel B, et al. Molecular Dissection of an Outbreak of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Reveals Intergenous KPC Carbapenemase Transmission through a Promiscuous Plasmid. Bush K, ed. *MBio*. 2011;2(6):e00204-11. doi:10.1128/mBio.00204-11
 271. Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, et al. Emergence of bla_{KPC-3}-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J*

- Antimicrob Chemother.* 2010;65(8):1608-1614. doi:10.1093/jac/dkq174
272. Paño-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San Francisco C, et al. Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(1):89-96. doi:10.1093/jac/dks364
 273. Palacios-Baena ZR, Oteo J, Conejo C, et al. Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain. *J Infect.* 2016;72(2):152-160. doi:10.1016/j.jinf.2015.10.008
 274. Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Gudíol C, Martínez JA. Treatment of infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32:49-55. doi:10.1016/S0213-005X(14)70174-0
 275. Jin Y, Song X, Liu Y, et al. Characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* as a cause of neonatal infection in Shandong, China. *Exp Ther Med.* 2017;13(3):1117-1126. doi:10.3892/etm.2017.4070
 276. Yu F, Hu L, Zhong Q, et al. Dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates with carbapenem resistance in integrated and emergency intensive care units in a Chinese tertiary hospital. *J Med Microbiol.* 2019;68(6):882-889. doi:10.1099/jmm.0.000981
 277. de Campos TA, Gonçalves LF, Magalhães KG, et al. A Fatal Bacteremia Caused by Hypermucoviscous KPC-2 Producing Extensively Drug-Resistant K64-ST11 *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Front Med.* 2018;5:265. doi:10.3389/fmed.2018.00265
 278. Shin J, Ko KS. A Plasmid Bearing the *bla*_{CTX-M-15} Gene and Phage P1-Like Sequences from a Sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):6608-6610. doi:10.1128/AAC.00265-15
 279. Andrade LN, Novais Â, Stegani LMM, et al. Virulence genes, capsular and plasmid types of multidrug-resistant CTX-M(-2, -8, -15) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from four major hospitals in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;91(2):164-168. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.007
 280. Politi L, Gartzonika K, Spanakis N, et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece: evidence of a widespread clonal outbreak. *J Antimicrob Chemother.* May 2019. doi:10.1093/jac/dkz176
 281. Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M, et al. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(11):2487-2492. doi:10.1093/jac/dkt237
 282. Ruiz-Garbajosa P, Hernández-García M, Beatobe L, et al. A single-day point-prevalence study of faecal carriers in long-term care hospitals in Madrid (Spain) depicts a complex clonal and polyclonal dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(2):348-352. doi:10.1093/jac/dkv355
 283. David S, Reuter S, Harris SR, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol.* July 2019. doi:10.1038/s41564-019-0492-8
 284. Merino I, Shaw E, Horcajada JP, et al. CTX-M-15- H 30Rx-ST131 subclone is one of the main causes of healthcare-associated ESBL-producing *Escherichia coli* bacteraemia of urinary origin in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2125-2130. doi:10.1093/jac/dkw133
 285. Tchesnokova VL, Rechkina E, Chan D, et al. Pandemic uropathogenic fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* have enhanced ability to persist in the gut and cause bacteriuria in healthy women. *Clin Infect Dis.* July 2019. doi:10.1093/cid/ciz547
 286. Matsumura Y, Peirano G, Devinney R, et al. Genomic epidemiology of global VIM-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(8):2249-2258. doi:10.1093/jac/dkx148
 287. Peirano G, Lascols C, Hackel M, Hoban DJ, Pitout JDD. Molecular epidemiology of

- Enterobacteriaceae* that produce VIMs and IMPs from the SMART surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(3):277-281. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.024
288. Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First Outbreak of a Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing OXA-48 β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(9):4398-4401. doi:10.1128/AAC.00329-11
 289. Glupczynski Y, Huang T-D, Bouchahrouf W, et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(2):168-172. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.10.005
 290. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):432-438. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x
 291. Gona F, Barbera F, Pasquariello AC, et al. In vivo multiclonal transfer of blaKPC-3 from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in surgery patients. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(10):O633-O635. doi:10.1111/1469-0691.12577
 292. Sánchez-López, J.; Hernández-García, M.; Massone, C.A.; Moreno-Núñez, P.; López-Fresneña, N; Morosini, M.I.; Cantón, R.; Ruiz-Garbajosa P. *Diseminación de Klebsiella Pneumoniae-ST307 Productora de KPC-3 Asociada a La Emergencia de La Resistencia a Ceftazidima-Avibactam En Un Hospital Terciario de Madrid*. Madrid; 2019. file:///C:/Users/Usuario/Downloads/congreso2019_eimc.pdf.
 293. Fernández J, Montero I, Martínez Ó, et al. Dissemination of multiresistant *Enterobacter cloacae* isolates producing OXA-48 and CTX-M-15 in a Spanish hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;46(4):469-474. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.07.003
 294. Potron A, Nordmann P, Rondinaud E, Jaureguy F, Poirel L. A mosaic transposon encoding OXA-48 and CTX-M-15: towards pan-resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(2):476-477. doi:10.1093/jac/dks397
 295. Brañas P, Villa J, Viedma E, Mingorance J, Orellana MA, Chaves F. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;46(1):111-116. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.02.019
 296. Arana DM, Ortega A, González-Barberá E, et al. Carbapenem-resistant *Citrobacter* spp. isolated in Spain from 2013 to 2015 produced a variety of carbapenemases including VIM-1, OXA-48, KPC-2, NDM-1 and VIM-2. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(12):3283-3287. doi:10.1093/jac/dkx325
 297. Bedenić B, Sardelić S, Luxner J, et al. Molecular characterization of class b carbapenemases in advanced stage of dissemination and emergence of class d carbapenemases in *Enterobacteriaceae* from Croatia. *Infect Genet Evol*. 2016;43:74-82. doi:10.1016/j.meegid.2016.05.011
 298. Hajjej Z, Gharsallah H, Naija H, Boutiba I, Labbene I, Ferjani M. Successful treatment of a Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla_{OXA-48}, bla_{VIM-2}, bla_{CMY-2} and bla_{SHV} with high dose combination of imipenem and amikacin. *IDCases*. 2016;4:10-12. doi:10.1016/j.idcr.2016.01.003
 299. Poirel L, Abdelaziz MO, Bernabeu S, Nordmann P. Occurrence of OXA-48 and VIM-1 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Egypt. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(1):90-91. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.08.015
 300. Galani I, Nafplioti K, Adamou P, et al. Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):167. doi:10.1186/s12879-019-3801-1
 301. Hawkey PM, Warren RE, Livermore DM, et al. Treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria: report of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy/Healthcare Infection Society/British Infection Association Joint Working

- Party†. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(suppl_3):iii2-iii78. doi:10.1093/jac/dky027
302. Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Cobos-Trigueros N, et al. Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(5):337.e1-337.e21. doi:10.1016/j.eimc.2014.11.009
303. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 Suppl 1:1-55. doi:10.1111/1469-0691.12427
304. Butini ME, Abbandonato G, Di Rienzo C, Trampuz A, Di Luca M. Isothermal Microcalorimetry Detects the Presence of Persister Cells in a *Staphylococcus aureus* Biofilm After Vancomycin Treatment. *Front Microbiol*. 2019;10:332. doi:10.3389/fmicb.2019.00332
305. Flores D, Panic G, Braissant O, Keiser J. A novel isothermal microcalorimetry tool to assess drug effects on *Ancylostoma ceylanicum* and *Necator americanus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(2):837-846. doi:10.1007/s00253-015-7081-4
306. Boillat-Blanco N, Furustrand T, Jaton K, Trampuz A. Susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus* by isothermal microcalorimetry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;83(2):139-143. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.006
307. Braissant O, Muller G, Egli A, et al. Seven Hours to Adequate Antimicrobial Therapy in Urosepsis Using Isothermal Microcalorimetry. *J Clin Microbiol*. 2014;52(2):624-626. doi:10.1128/JCM.02374-13
308. Antoce OA, Antoce Vasile, Takahashi Katsutada, Pomohaci Nicolai NI. Calorimetric determination of the inhibitory effect of C1-C4 n-alcohols on growth of some yeast species. *Thermochim Acta*. 1997;297:33-42. doi:https://doi.org/10.1016/S0040-6031(97)00162-7
309. World Health Organization. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. World Health Organization. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>. Published 2015.

ANEXOS

Fecal Carriage of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*: a Hidden Reservoir in Hospitalized and Nonhospitalized Patients

Desirée Gijón,^a Tânia Curiao,^a Fernando Baquero,^{a,b} Teresa M. Coque,^{a,b} and Rafael Cantón^{a,b}

Servicio de Microbiología and CIBER en Epidemiología y Salud Pública and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain,^a and Unidad de Resistencia Antibiótica y Virulencia Bacteriana Asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain^b

Fecal carriage of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) has not been extensively investigated, except in the cases of selected patients at risk, mostly during outbreaks. A total of 1,100 fecal samples randomly collected in our institution in two different periods in 2006 ($n = 600$) and 2009–2010 ($n = 500$) from hospitalized (26.8%) and nonhospitalized (73.2%) patients were screened for CPE. The first period coincided with an outbreak of VIM-1-producing *Enterobacteriaceae*, and the second one coincided with the emergence of KPC enzymes in our hospital. Diluted samples in saline were cultured in Luria-Bertani broth with 1 $\mu\text{g/ml}$ imipenem and subcultured in MacConkey agar plates with 4 $\mu\text{g/ml}$ ceftazidime. Growing colonies were screened for CPE (modified Hodge test and EDTA and boronic acid synergy tests). Carbapenemase genes, plasmids in which they are located, and clonal relatedness were determined. Individuals who exhibited fecal carriage of CPE (11/1,043, 1.1%; 95% confidence interval [CI], 0.53 to 1.88) included 8 hospitalized (carriage rate, 2.9%; 95% CI, 1.24 to 5.55) and 3 nonhospitalized patients (carriage rate, 0.4%; 95% CI, 0.08 to 1.14), the latter being identified in 2009. Eighty-two percent of colonized patients were not infected with CPE. Isolates harboring *bla*_{VIM-1} with or without *bla*_{SHV-12} were identified as *Klebsiella pneumoniae* ($n = 8$; ST39, ST688, ST253, and ST163), *Enterobacter cloacae* ($n = 3$; two pulsed-field gel electrophoresis [PFGE] types), *Escherichia coli* ($n = 2$; ST155 and ST2441), and *Citrobacter freundii* ($n = 1$). Some of these lineages had previously been detected in our institution. The *bla*_{VIM-1} gene was a member of the class 1 integrons In110 (*bla*_{VIM-1}-*aacA4-aadA1*) and In113 (*bla*_{VIM-1}-*aacA4-dhfrII*) located on plasmids IncN ($n = 11$; 30 to 50 kb) and IncHI2 ($n = 3$; 300 kb), respectively. Dissemination of *bla*_{VIM-1} class-1 integrons within highly transferable plasmids in a polyclonal population has potentially contributed to the maintenance and spread of CPE.

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) isolates have been increasingly reported in Europe (13, 20). They include enzymes belonging to the Ambler classes A (KPC types), B (VIM, IMP, and more recently NDM enzymes), and D (OXA-48). With the exception of OXA-48, these enzymes confer high-level resistance to most β -lactam compounds, such as penicillins and cephalosporins, but variably affect susceptibility to carbapenems (20, 32). Unlike in other South European countries such as Greece and Italy, the prevalence of CPE in Spain remains low and is mainly related to VIM-producing isolates (13, 28, 31, 35). Nevertheless, KPC-2-, KPC-3-, NDM-1-, and OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* were recently detected in our country (6, 10, 24, 30).

Fecal carriage of CPE isolates has been investigated rarely compared with carriage of isolates producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) (17, 18, 35, 36), particularly among patients not selected for their relation to outbreak cases. In addition, few surveillance culture recommendations are available for detecting CPE (1, 26, 36).

The objectives of the present study were to evaluate the prevalence of intestinal colonization with CPE in nonselected hospitalized and nonhospitalized patients from the same geographic area of Madrid during two different periods (2006 and 2009–2010), coinciding with CPE outbreak episodes in our institution (10, 31). Our study also assessed a microbiology protocol for screening these isolates in fecal material. Surveillance studies might serve for the implementation of control measures to curtail the spread of these isolates, both in the hospital and in the community. This approach has been recommended for vancomycin-resistant enterococci and ESBL-producing *Enterobacteriaceae* (7, 16).

MATERIALS AND METHODS

Epidemiological background. The presence of CPE isolates was sought among 1,100 fecal samples randomly selected from those submitted ($n = 11,474$) to our laboratory for detection of enteropathogens ($n = 9,842$, 25.8% from hospitalized patients and 74.2% from nonhospitalized patients) or *Clostridium difficile* toxins ($n = 1,632$, 83.8% from hospitalized patients and 16.2% from nonhospitalized patients) during two different periods. The first period, January to April 2006, was coincidental with an outbreak of metallo- β -lactamase (MBL)-producing *Enterobacteriaceae* (31). The second, July 2009 to January 2010, corresponds to the months when KPC enzymes emerged in our institution and the ongoing presence of VIM isolates was detected (10). In the first period, fecal samples ($n = 600$) were recovered from 569 patients, 114 (20%) hospitalized and 455 (80%) nonhospitalized. In the second period, we studied samples ($n = 500$) from 474 patients, 166 (35%) hospitalized and 308 (65%) nonhospitalized. Patient clinical charts were reviewed to obtain epidemiological data. The study was approved by the ethical committee from our institution (reference number CEIC 210/06).

Screening protocol for CPE isolates in fecal samples and its assessment. Figure 1 shows the working protocol for fecal samples. Briefly, 100 μl of saline fecal suspension (one full planting loop in 3 ml of saline) was

Received 3 January 2012 Returned for modification 16 January 2012

Accepted 25 February 2012

Published ahead of print 7 March 2012

Address correspondence to Rafael Cantón, rcanton.hrc@salud.madrid.org.

D.G. and T.C. contributed equally to this article.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00020-12

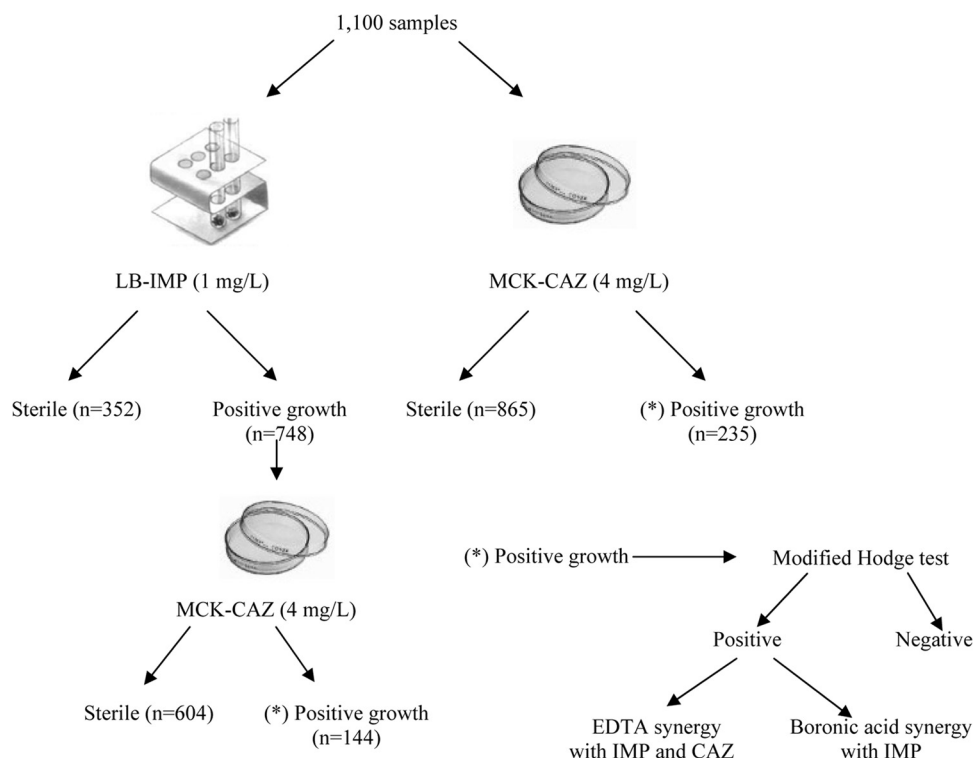


FIG 1 Schematic representation of the working protocol. A total of 1,100 saline fecal suspensions were cultured in both MacConkey plates supplemented with 4 μ g/ml of ceftazidime (MCK-CAZ) and Luria-Bertani broth with 1 μ g/ml of imipenem (LB-IMP). Positive tubes of LB-IMP were subcultured in MCK-CAZ plates, and colonies from both media were tested for carbapenemase production (see Materials and Methods for further details).

cultured either in 2 ml tubes of Luria-Bertani broth (Pronadisa, Madrid, Spain) supplemented with imipenem (1 μ g/ml) or in MacConkey agar plates (Oxoid Ltd., Basingstoke, England) supplemented with ceftazidime (4 μ g/ml). Tubes and plates were incubated for 18 h and 48 h, respectively. Growth in tubes and each different colony that grew in ceftazidime-MacConkey plates, based on phenotypic morphology, were subcultured in selective ceftazidime-MacConkey plates for further analysis. Isolates from the same patient exhibiting different colonial morphotypes were also studied. The isolates from subcultured ceftazidime-MacConkey plates were identified using the WIDER system (Fco. Soria-Melguizo, Madrid, Spain) and/or MALDI TOF MS (Microflex LT instrument using the FlexControl 3.0 and MALDI BioTyper 2.0 software; Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).

All colonies were screened for carbapenemase production using the modified Hodge test (9). The positive ones were screened for MBL, KPC, or OXA-48 carbapenemase production. MBL production was assessed using the double-disk synergy test (MBL-DDST) consisting of imipenem (10 μ g) and ceftazidime (30 μ g) disks placed 20 mm (center to center) from a disk containing 1.9 mg of EDTA (31, 38). Enhancement of the inhibition zone in the area between the imipenem or ceftazidime disk and the EDTA disk was considered a positive result for MBL. KPC production was inferred by the increase in the inhibition zone of a meropenem disk compared with that of a meropenem disk supplemented with 0.3 mg of boronic acid (12). Presence of OXA-48 enzyme was searched for by PCR (see below). Phenotypic detection of ESBL was inferred by the ESBL-DDST using cefotaxime (30 μ g), ceftazidime (30 μ g), and amoxicillin-clavulanate (20 to 10 μ g) disks (2).

In order to assess the sensitivity of the screening protocol, the detection limit (CFU/ml) was determined using CPE strains that had been characterized previously and that were representative of strains producing VIM-1 (*Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae*) (31), NDM-1 (*K. pneumoniae* NTCT 13443 strain), KPC-2 (*Escherichia coli*) and KPC-3 (*K.*

pneumoniae) (reference 10 and this study), and OXA-48 (*E. coli*, kindly supplied by Patrice Nordmann, and *E. cloacae*, kindly supplied by Manuel Rodríguez-Iglesias and Luis Martínez-Martínez), as well as the susceptible reference strain *E. coli* ATCC 25922.

Serial dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , and 10^{-4}) of a starting inoculum of $\sim 1 \times 10^9$ CFU/ml of each strain were made in 3 ml of saline and thoroughly mixed with one full planting loop of a fecal sample from a healthy volunteer negative for CPE. After an hour, 100 μ l of each dilution was cultured on selective medium by using the protocol described above. The detection rate was calculated as the proportion of number of colonies of each strain growing on MacConkey-ceftazidime plates versus the initial inoculum size.

Susceptibility testing. Antibiotic susceptibility testing was performed using the WIDER system (Fco. Soria-Melguizo). Carbapenem susceptibility was also performed by Etest (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and results were interpreted according to EUCAST criteria (<http://www.eucast.org>).

Clonal relatedness. Clonal relatedness was established by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of XbaI (New England BioLabs, Inc.) digested genomic DNA (34). Multilocus sequencing typing (MLST) was also performed in *K. pneumoniae* (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>) and *Escherichia coli* (<http://www.mlst.net>) isolates. Clonal relatedness between the isolates recovered in this study and CPE isolates recovered in clinical samples from patients involved in the contemporary outbreaks due to MBL or KPC producing isolates in our institution was analyzed (10, 31).

Characterization of bla genes and analysis of the genetic environment of MBL genes. Genes encoding carbapenemases (*bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GES}, and *bla*_{KPC}) and ESBLs (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{CTX-M}) were sought by PCR using previously described primers and conditions and sequenced further (22, 31). *bla*_{NDM} was detected by using primers NDM1-F (5'-AAGCTGAGCACCAGCATTA-3', positions 3186 to 3169)

TABLE 1 Identification, frequency, and phenotypic characterization of bacterial isolates recovered from 1,100 fecal samples in selective media^a

Organism (no. isolated in 2006/no. in 2010)	Number of isolates with:							
	Positive MHT		Positive MBL-DDST		MBL (type)		ESBL-DDST	
	2006	2009-2010	2006	2009-2010	2006	2009-2010	2006	2009-2010
<i>Escherichia coli</i> (29/64)	1	2	0	2	0	2 (VIM-1)	21	30
<i>Enterobacter cloacae</i> (8/18)	2	3	2	1	2 (VIM-1)	1 (VIM-1)	1	0
<i>Citrobacter freundii</i> (5/18)	1	7	0	1	0	1 (VIM-1)	0	1
<i>Morganella morganii</i> (9/13)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3/17)	2	6	2	6	2 (VIM-1)	6 (VIM-1)	1	3
<i>Hafnia alvei</i> (5/4)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i> (1/2)	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Citrobacter amalonaticus</i> (1/0)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter asburiae</i> (1/0)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i> (1/0)	0	0	0	0	0	0	0	0
Nonfermentative bacilli (40/40) ^b	5	1	5	0	0	0	0	0

^a See Materials and Methods for further details. Abbreviations: MHT, modified Hodge test; MBL-DDST, double-disk synergy test for MBL detection; MBL, metallo- β -lactamase; ESBL-DDST, double-disk synergy test for extended-spectrum- β -lactamase detection.

^b *Pseudomonas* spp. (10/7), *Stenotrophomonas maltophilia* (7/2), *Acinetobacter lwoffii* (6/2), *Sphingomonas paucimobilis* (1/0), and others (16/29).

and NDM1-R (5'-GCTCATCAGCATCATGCT-3', positions 2473 to 2490), designed according to the sequence of the *bla*_{NDM-1} gene in the GenBank database under accession no. [FN396876](#). For *bla*_{OXA-48}, primers OXA-48-F (5'-GTGGCATCGATTATCGGAAT-3', positions 2221 to 2240) and OXA-48-R (5'-AGCCCTAAACCATCCGATGT-3', positions 2933 to 2914), designed according to the sequence of the *bla*_{OXA-48} gene in the GenBank database, under accession no. [AY236073](#) were used. Characterization of class 1 integrons containing *bla*_{MBL} was performed by PCR, sequencing, comparison of the restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns obtained by PCR, and further digestion with AluI enzyme. DNA of each integron showing a distinct RFLP type was sequenced using specific primers as previously described (33).

Transferability and location of *bla*_{MBL} genes. Mating experiments were performed using *E. coli* strain BM21, which is nalidixic acid and rifampin resistant, lactose fermentation positive, and plasmid free, as the recipient (2, 31). Transconjugants were selected on Luria-Bertani agar plates containing ceftazidime (4 mg/liter) and rifampin (300 mg/liter) and were incubated at 37°C for 24 h. Plasmid location of carbapenemase gene was assessed by hybridization of S1-digested genomic DNA with *bla* gene probes (15). Transfer and hybridization were performed by standard procedures. Labeling and detection were conducted by using a commercial AlkPhos kit (Amersham Life Sciences, Uppsala, Sweden) following the manufacturer's instructions.

Plasmid incompatibility groups were inferred according to the sequences obtained by using the PCR replicon-typing scheme described by Carattoli et al. (3). PCR results were confirmed by hybridization of S1 nuclease-digested genomic DNA from *E. coli* transconjugants (or wild-type strains in the absence of transfer) with appropriate probes (31).

RESULTS

Fecal carriage of CPE in hospitalized and nonhospitalized patients and carbapenemase characterization. Fourteen of 1,100 fecal samples contained CPE. These samples were obtained from 11 of 1,043 (1.1%, exact 95% confidence interval [CI], 0.53 to 1.88) individual colonized patients; 8 were hospitalized patients (carriage rate, 2.9%; 95% CI, 1.24 to 5.55), and 3 were nonhospitalized patients (carriage rate, 0.4%; 95% CI, 0.08 to 1.14). There was no increase in the frequency of carbapenemase fecal carriers in hospitalized patients from 2006 [3.5% (4/114); CI, 0.96 to 8.74] to 2009–2010 [2.4% (4/166); CI, 0.66 to 6.05], but carbapenemase colonization in nonhospitalized patients emerged in the second period (1% [3/308]; CI, 0.20 to 2.82).

During the first period studied (January to April 2006), a total of 103 Gram-negative bacilli, including 40 nonfermentative isolates, were recovered in selective medium (Table 1). Four isolates displayed a consistently positive MBL-DDST with a positive *bla*_{VIM} PCR result. These isolates were recovered from four hospitalized patients that were admitted to oncology and vascular surgery wards and general surgery and cardiovascular intensive care units. Two of these patients were also infected with an MBL-producing isolate, whereas the other two displayed only intestinal colonization. These isolates harbored *bla*_{VIM-1} and were identified as *K. pneumoniae* and *E. cloacae* (Table 2) isolates which showed PFGE patterns identical to those of VIM-1 epidemic clones (KPMBL-A-ST39 and ECMBL-A) that were previously detected in clinical samples in our institution (31). The epidemic *K. pneumoniae* clone also expressed SHV-12 and SHV-11.

In the second period studied (July 2009 to January 2010), a total of 176 Gram-negative bacilli were recovered. Ten isolates were CPE, later confirmed as MBL producers, and colonized 7 patients, 4 of them hospitalized in internal medicine ($n = 2$), nephrology ($n = 1$), and neurology ($n = 1$) wards (Tables 1 and 2). It should be noted that the remaining isolates were recovered from 3 nonhospitalized patients, only one of whom had been previously hospitalized (three months earlier in an internal medicine ward). None of these patients were infected with MBL-producing isolates, and contact with patients previously infected or colonized with these organisms was not demonstrated. All isolates harbored *bla*_{VIM-1} and corresponded to six *K. pneumoniae* isolates (KPMBL-B, -C, and -D clones), two *E. coli* isolates (ECOMBL-A and -B clones), one *E. cloacae* isolate and one *Citrobacter freundii* isolate (Table 2). One outpatient was simultaneously colonized with two *K. pneumoniae* isolates displaying different colonial morphotypes, both belonging to clone KPMBL-D-ST163, and one *bla*_{VIM-1} *C. freundii* isolate. In addition, one hospitalized patient was simultaneously colonized by a *K. pneumoniae* isolate (KPMBL-C) and an *E. cloacae* isolate (ECMBL-B clone) (Table 2).

Overall, 13 isolates (4 in the first period and 9 in the second one) displayed positive results in the MHT but were not confirmed as carbapenemase producers (false-positive results). This

TABLE 2 Epidemiological data for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates^a

Species (no. of isolates)	PFGE type	Strain identification	MLST	Patient	Ward(s) and/or patient status	Mo and yr of isolation	Plasmid size(s) (kb) ^b	Inc group	Integron type	Co-resistance(s)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (8)	KPMBL-A	RYC034268	ST39	A	Oncology ^c	Mar-06	<u>50</u> , 100, 250	N	B	Gm, Tb, Ak, Na, Fos, SXT
		RYC042800	ST39	B	General surgery ^d	Mar-06	<u>30</u> , 100, 250	N	B	Gm, Tb, Ak, Na, Cip, Fos, SXT
	KPMBL-B	RYC165502	ST688	C	Internal Medicine	Nov-09	50	N	B	SXT, Fos
	KPMBL-C	RYC116749.1	ST253	D	Neurology	Aug-09	300	HI2	A	None
	KPMBL-D	RYC197897	ST163	E	Internal Medicine	Jan-10	<u>50</u>	N	B	Na, SXT
		RYC197365.2 ^e	ST163	F	Outpatient ^f	Jan-10	<u>50</u>	N	B	SXT, Fos
		RYC197365.3 ^e	ST163	F	Outpatient ^f	Jan-10	<u>50</u>	N	B	SXT
		RYC197894	ST163	G	Outpatient	Jan-10	<u>50</u>	N	B	Na, SXT
<i>Enterobacter cloacae</i> (3)	ECMBL-A	RYC023986		H	Medical ICU	Feb-06	100, <u>300</u>	HI2	A	Na, Cip, Fos, SXT
		RYC035509		I	Cardiovascular ICU	Mar-06	100, <u>300</u>	HI2	A	Na, Fos, SXT
	ECMBL-B	RYC116749.2		D	Neurology	Aug-09	<u>50</u> , 320	N	B	SXT
<i>Escherichia coli</i> (2)	ECOMBL-A	RYC115509	ST2441	J	Outpatient	Aug-09	<u>50</u>	N	B	Tb, SXT
	ECOMBL-B	RYC165481	ST155	K	Nephrology	Nov-09	<u>50</u>	N	B	Tb, Na, Cip, SXT
<i>Citrobacter freundii</i> (1)	CFMBL-A	RYC197365.1		F	Outpatient ^f	Jan-10	<u>50</u>	N	B	Na, SXT

^a Abbreviations: ICU, intensive care unit; Na, nalidixic acid; Cip, ciprofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfonamide; Ak, amikacin; Gm, gentamicin; Tb, tobramycin.

^b Boldface indicates the size of the *bla*_{VIM-1}-carrying plasmids, determined by hybridization; underlining indicates plasmids transferred by conjugation.

^c This patient was also infected with *K. pneumoniae* KPMBL-A (respiratory infection).

^d This patient was also infected with *K. pneumoniae* KPMBL-A (bacteremia and respiratory infection).

^e RYC197365.2 and RYC197365.3 exhibited a different morphotype.

^f This patient was previously admitted to a digestive disease ward.

could be due to ESBL production or hyperproduction of AmpC, as reported before (5, 25).

NDM-, KPC-, and OXA-type carbapenemase-producing isolates were not found in either of the studied periods.

Variability in antibiotic susceptibility. All VIM-1 positive isolates were resistant to all penicillin inhibitor combinations and broad-spectrum cephalosporins. However, some VIM-positive isolates were susceptible to imipenem (MIC range, 0.25 to 4 µg/ml), meropenem (0.125 to 4 µg/ml), ertapenem (0.094 to 16 µg/ml), and doripenem (0.094 to 12 µg/ml) based on the Etest results. Using the EUCAST epidemiological cutoff (ECOFF) values, a number of isolates displayed MICs higher than the corresponding ECOFF values for imipenem (5 isolates), meropenem (13 isolates), doripenem (13 isolates) and ertapenem (14 isolates). As previously observed, differences in susceptibility levels to carbapenems among isolates belonging to the same PFGE clone were found (32). Although aztreonam is not hydrolyzed by MBLs, two *K. pneumoniae* isolates and two *E. cloacae* isolates recovered in 2006 were resistant to this antibiotic due to the expression of SHV-12 or AmpC hyperproduction, respectively. Non-β-lactam antibiotic resistances are shown in Table 2.

Clonal background. An apparently high clonal diversity was observed among *K. pneumoniae* VIM-1 isolates (8 isolates corresponded to 4 PFGE types). Nevertheless, MLST studies revealed that most of them belonged to clonal complex 23 (CC23): ST163 and its single-locus variants ST253 and ST39 (<http://eburst.mlst.net/>). KPMBL-A-ST39 (*n* = 2) was recovered in 2006 from two unrelated patients, KPMBL-D-ST163 (*n* = 4) was recovered in

2010 from two outpatients and one hospitalized patient, and KPMBL-C-ST253 (*n* = 1) was recovered in 2009 from a hospitalized patient. The new type ST688, identified in a single patient, corresponded to the PFGE type KPMBL-B (Table 2). *K. pneumoniae* ST253 has already been associated with human hosts, while ST163 has been recovered from a horse in The Netherlands (<http://www.mlst.net/>).

The VIM-1 *E. coli* isolates belonged to the major complex CC155, which is usually associated with urinary tract infections (37), and to a new sequence type (ST2441). Different VIM-1 *E. cloacae* clones were detected in the two study periods, the ones from 2009–2010 being unrelated to those recovered during our institutional outbreak (31). A carbapenemase-producing *C. freundii* isolate was found for the first time in our hospital.

***bla*_{VIM-1} is part of the In110 and In113 integrons located on IncN and IncHI2 plasmids.** The *bla*_{VIM-1} genes were located within the class 1 integrons In110 and In113, which were identified in our institution during an outbreak and arbitrarily designated types A and B, respectively (31, 32). In110 (type A) [*bla*_{VIM-1}-*aacA4-aadA1*, ca. 2.5 kb] was identified in two of three *E. cloacae* isolates and in only one *K. pneumoniae* isolate. In113 (type B) [*bla*_{VIM-1}-*aacA4-dhfrII* (also called *dfrB1*)-*aadA1-catB2*, 4 kb] was detected in all but one *K. pneumoniae*, in one *E. cloacae*, and in all *E. coli* and *C. freundii* isolates. As previously observed, In110 was detected mainly in IncHI2 plasmids of 300 kb, whereas In113 was recovered from IncN plasmids between 30 and 50 kb (Table 2). Plasmids were transferred by conjugation in almost all strains (12 of 14).

Screening method assessment. Not every CPE isolate recovered from the screening procedure was detected in both selective media. There were 5 carbapenemase-producing isolates that grew only in MacConkey-ceftazidime agar plates, not in LB-imipenem broth. It is also of note that 48 isolates grew only in LB-imipenem broth and were not later confirmed as carbapenemase producers.

The detection limit of the screening method when MacConkey-ceftazidime agar plates were used varied, with KPC and NDM variants showing the lowest values (≤ 10 CFU/ml) and VIM-1 producers showing the highest values (range, ≤ 10 to 2.1×10^2 CFU/ml). In the case of LB-imipenem broth plus MacConkey-ceftazidime agar plates, no better detection was observed (data not shown). Unlike the OXA-48-producing *E. cloacae* isolate (which also produced CTX-M-9), the OXA-48 producing *E. coli* isolate was able to grow only in LB-imipenem broth and not in MacConkey-ceftazidime agar plates.

DISCUSSION

Spread of CPE has been increasingly reported worldwide. Among them, MBL producers are prevalent in Asia and Europe, whereas KPC producers prevail in the United States (13, 25). CPE are still uncommon in Spain, although isolates producing MBL and, less frequently, KPC or OXA-48 enzymes have been reported (6, 10, 25, 31, 32, 36). A prevalence of 0.04% of MBL-producing *Enterobacteriaceae* isolates, which include VIM-1- and IMP-producing *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *E. coli*, and *E. cloacae* isolates, was reported in a multicenter study performed in 2009, highlighting a nationwide distribution of these isolates in different Spanish regions (Madrid, Catalonia, Balearic Islands, and Andalusia) (21).

The frequency of CPE fecal colonization in our study is higher than the clinical prevalence previously found in Spanish hospitals (21), although it is still lower than that reported in another study in hospitalized patients in France during a nonoutbreak period (5.3%) (36). Colonization of patients from the community setting with CPE, all of them MBL producers, is also remarkable. These results are an alert for a hidden fecal carriage of MBL-producing isolates, as a high percentage of the isolates from positive fecal carriers (82%, 9 of 11 patients) were not infected with CPE isolates. Since the intestinal compartment could be a reservoir of resistant organisms, active surveillance studies can be implemented to detect fecal carriers. Such a surveillance system was established in Israel in the context of a nationwide epidemic and significantly decreased the spread of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates all over the country (29). Performing surveillance cultures when CPE prevalence remains low might avoid a trend toward endemicity, particularly in acute-care facilities (8).

Currently, there are no consensus recommendations on the detection of CPE fecal carriers. The combined use of an enriched broth supplemented with a carbapenem and a solid selective medium (MacConkey agar) supplemented with ceftazidime might increase the detection of carbapenemase fecal carriers. Nevertheless, the inclusion of a broth medium increases the laboratory workload. Some authors have proposed the use of chromogenic media for ESBL-producing isolates (1, 4). These ESBL-chromogenic media lack specificity for CPE, increasing the need for laboratory confirmation tests to discriminate CPE from ESBL producers. This is also the case in our method. Furthermore, the chromogenic media have also been shown to be inefficient for the detection of OXA-48 producers (4, 26). In the screening method assessment, we efficiently detected VIM, NDM, and KPC produc-

ers but not OXA-48 producers. Nevertheless, we were able to detect the OXA-48 *E. cloacae* isolate also coproducing an ESBL but not the *E. coli* control strain expressing only OXA-48. The problem of developing a method of detecting OXA-48 producers remains unsolved, although a phenotypic method for the detection of fecal carriage of OXA-48 *Enterobacteriaceae* was very recently proposed (26).

Despite the limitation of partial ineffective detection of OXA-48 producers, the method used was adequate for the detection of MBL and KPC carbapenemase producers for which carbapenem MICs were even in the susceptible clinical category. Likewise, in other studies that have been conducted for KPC-producing *K. pneumoniae* isolates (14), 1 μ g/ml of imipenem was adequate for the recovery of MBL-producing *Enterobacteriaceae* from stool specimens. In fact, variations in carbapenem susceptibility of carbapenemase producers support the importance of basing the screening on ceftazidime rather than on imipenem. However, the use of imipenem is not always recommended due to its potential instability compared with other carbapenems.

Our study also revealed a polyclonal structure of VIM-1 producers regardless of the spread of some specific clones. *K. pneumoniae* isolates were distributed on different PFGE types and STs, although they belonged to the same complex, CC23, detected in hospitalized and nonhospitalized patients (37). This reflects the high risk of specific clones penetrating and disseminating in both settings. As far as we know, the *K. pneumoniae* STs found in our study have not yet been associated with *bla*_{VIM-1} (27) (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>). ST155 *E. coli* has been frequently associated with the spread of *bla*_{CTX-M-14} in healthy volunteers, which illustrates the role of widespread clones as vehicles of different *bla* genes.

Finally, the identification of the integrons In110 and In113, which were previously detected in our hospital and other Spanish institutions (31, 32), suggests endemicity of these elements and/or the IncN and IncHI2 plasmids in which they are located. IncN plasmids are increasingly associated with carbapenemase-encoding genes (both KPC and VIM types) in *Enterobacteriaceae* (11, 23). This reflects, as recently demonstrated (19), the high risk of intra- and interspecies horizontal transmission of carbapenemase genes among successful genetic platforms, enhancing their dissemination and persistence.

In conclusion, we describe fecal carriage of CPE, all of them MBL producers, mainly in patients not infected with these organisms in our hospital since 2006 and also in the surrounding geographic area since 2009. These results are an alert for hidden fecal carriage in patients with CPE that would not otherwise have been detected, as most of them were not infected with these organisms and had no demonstrated contact with infected or colonized patients. Moreover, the dissemination of highly transferable plasmids containing *bla*_{VIM-1}-class 1 integrons among a variety of clones of different species has potentially contributed to the penetration, spread, and maintenance of CPE over time, leading to endemicity.

ACKNOWLEDGMENTS

T.C. is supported by a fellow research contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant FI09/00901). This study was funded by research grants from the European Commission (LSHMCT-2008-223031 and FP7-HEALTH-2010-282512) and the CIBERESP Network for Bio-

medical Research in Epidemiology and Public Health (Instituto Carlos III, Spanish Ministry of Science and Innovation, reference number CB06/02/0053).

REFERENCES

- Adler A, et al. 2011. Laboratory and clinical evaluation of screening agar plates for detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from surveillance rectal swabs. *J. Clin. Microbiol.* 49:2239–2242.
- Cantón R, et al. 2002. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J. Clin. Microbiol.* 40:1237–1243.
- Carattoli A, et al. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63:219–228.
- Carrér A, Fortineau N, Nordmann P. 2010. Use of ChromID extended-spectrum β -lactamase medium for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 48:1913–1914.
- Carvalhoes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. 2010. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:249–251.
- Cendejas E, Gómez-Gil R, Gómez-Sánchez P, Mingorance J. 2010. Detection and characterization of *Enterobacteriaceae* producing metallo- β -lactamases in a tertiary-care hospital in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:181–183.
- Centers for Diseases Control and Prevention. 1995. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. Recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 44:1–13.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 58:256–260.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 19th informational supplement. CLSI document M100–S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Curiao T, et al. 2010. Emergence of *bla* KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:1608–1614.
- García-Fernández A, et al. 2011. Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:1987–1991.
- Giske CG, et al. 2011. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:552–556.
- Grundmann H, et al. 2010. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill.* 15:19711.
- Landman D, Salvani JK, Bratu S, Quale J. 2005. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. *J. Clin. Microbiol.* 43:5639–5641.
- Liu SL, Hessel A, Sanderson KE. 1993. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:6874–6878.
- Lucet JC, et al. 1999. Control of a prolonged outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a university hospital. *Clin. Infect. Dis.* 29:1411–1418.
- Mammina C, et al. 2007. Surveillance of multidrug-resistant gram-negative bacilli in a neonatal intensive care unit: prominent role of cross transmission. *Am. J. Infect. Control* 35:222–230.
- March A, et al. 2010. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:934–944.
- Mathers AJ, et al. 2011. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. *mBio* 2:e00204–11.
- Miriagou V, et al. 2010. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:112–122.
- Miró E, et al. 2010. Estudio de la prevalencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas y carbapenemasas en *Enterobacterias* en España, abstr. 706, p 321. XIV Congreso SEIMC.
- Monstein HJ, et al. 2007. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS* 115:1400–1408.
- Novais A, et al. 2007. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:796–799.
- Pitart C, et al. 2011. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:4398–4401.
- Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:440–458.
- Ruppé E, et al. 2011. Development of a phenotypic method for detection of fecal carriage of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* after incidental detection from clinical specimen. *J. Clin. Microbiol.* 49:2761–2762.
- Samuelsen O, et al. 2011. Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:1811–1816.
- Sánchez-Romero I, et al. 2012. Nosocomial outbreak of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of multilocus sequence type 15: molecular basis, clinical risk factors, and outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:420–427.
- Schwaber MJ, et al. 2011. Israel Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Working Group. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin. Infect. Dis.* 52:848–855.
- Solé M, et al. 2011. First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:4402–4404.
- Tato M, et al. 2007. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo- β -lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin. Infect. Dis.* 45:1171–1178.
- Tato M, et al. 2010. Carbapenem heteroresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging to the same clone: consequences for routine susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 48:4089–4093.
- Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R. 2010. Dispersal of carbapenemase *bla*_{VIM-1} gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:320–327.
- Tenover FC, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233–2239.
- Tórtola MT, et al. 2005. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3492–3494.
- Vidal-Navarro L, Pfeiffer C, Bouzuges N, Sotto A, Lavigne JP. 2010. Faecal carriage of multidrug-resistant Gram-negative bacilli during a non-outbreak situation in a French university hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:2455–2458.
- Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:736–755.
- Yong D, et al. 2002. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 40:3798–3801.

Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain

Patricia Ruiz-Garbajosa^{1*}, Tania Curiao^{1,2}, Marta Tato¹, Desirée Gijón¹, Vicente Pintado³, Aránzazu Valverde^{1,4}, Fernando Baquero^{1,2,5}, María Isabel Morosini¹, Teresa M. Coque^{1,2,5} and Rafael Cantón^{1,5}

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; ²CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain; ³Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; ⁴Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense, Madrid, Spain; ⁵Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

*Corresponding author: Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain. Tel: +34-913368330; Fax: +34-913368809; E-mail: pruiizg@salud.madrid.org

Received 15 January 2013; returned 21 February 2013; revised 16 May 2013; accepted 21 May 2013

Objectives: To analyse the ongoing epidemiology of KPC-producing Enterobacteriaceae after a non-ST258 KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a university hospital in Madrid, Spain.

Methods: Enterobacterial isolates (one per patient based on bacterial identification and typing patterns) with carbapenem MICs higher than the EUCAST epidemiological cut-off values, a positive modified Hodge test and carbapenem/boronic acid combination disc test results were studied (16 March 2010 to 31 January 2012) and compared with KPC-producing isolates previously described in our institution (September 2009 to February 2010). The bacterial population structure (PFGE and multilocus sequence typing), carbapenemase genes and KPC plasmids were studied. Patients' clinical records were reviewed.

Results: Twenty-four KPC-producing Enterobacteriaceae (20 *K. pneumoniae*, 2 *Escherichia coli* and 2 *Enterobacter cloacae*) from 23 patients (13 males, median age 72 years) were studied. Most KPC-producer strains were considered as colonizers. Six *K. pneumoniae* clones (ST11, ST20, ST384, ST454, ST659 and ST971), two *E. coli* clones (ST224 and ST357) and one *E. cloacae* clone were identified. *bla*_{KPC-3} was located on IncFII_K plasmids of ~100 kb (*E. coli* ST357 and *K. pneumoniae* ST384, ST454, ST659 and ST971 clones) and on IncN plasmids of ~40 kb (*K. pneumoniae* ST11 clone). Non-typeable plasmids of ~20 kb containing *bla*_{KPC-2} were detected in scarcely represented clones (*K. pneumoniae* ST20, *E. coli* ST224 and *E. cloacae*).

Conclusions: During the 2 year period following the emergence of non-ST258 KPC-3-producing *K. pneumoniae* isolates in our institution, the *bla*_{KPC-3} and *bla*_{KPC-2} genes efficiently penetrated other Enterobacteriaceae lineages. Non-ST258 *K. pneumoniae* isolates were mostly responsible for the dissemination of KPC enzymes, producing a complex epidemiological picture.

Keywords: carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, carbapenem resistance, IncFII_K plasmids

Introduction

Genes coding for KPC enzymes are predominantly identified among *Klebsiella pneumoniae* isolates and, increasingly, among other Enterobacteriaceae and in *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter baumannii*.¹ Until recently, the global predominance of KPC-producing *K. pneumoniae* was associated with clonal group (CG) 258, comprising the globally spread sequence type (ST) 258, and a diversity of single- and double-locus variants including

ST11.^{1,2} Other widespread (e.g. ST437) and local STs have been sporadically identified in areas with a high prevalence of KPC isolates.³ These data indicate that *bla*_{KPC} genes have a potentially high risk of dissemination among different clones and species.^{4–6}

We previously described the emergence of KPC-3-producing *K. pneumoniae* in Spain that was not associated with CG258 clones.⁷ During a 5 month period (September 2009 to February 2010), KPC-3-producing ST384 and ST388 *K. pneumoniae* clones were recovered from seven and one patient, respectively, in

different hospital wards.⁷ In this study, we describe the ongoing epidemiology of KPC-producing Enterobacteriaceae in our institution, showing the dissemination of KPC enzymes in different *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* clones.

Methods

Bacterial isolates and study design

From 16 March 2010 through 31 January 2012, a total of 98 Enterobacteriaceae isolates with decreased carbapenem susceptibility according to the EUCAST epidemiological cut-off values (www.eucast.org), a positive modified Hodge test (MHT) and carbapenem/boronic acid combination disc test result were recovered from 23 patients. Clinical records of infected or colonized patients were retrospectively reviewed. Infection control measures were implemented after the detection of each new case as previously described.⁷ Surveillance samples (rectal, pharyngeal and wound swabs) were plated on chromID ESBL agar (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Growing colonies were sought for carbapenemase production.⁷

Bacterial identification and antibiotic susceptibility testing

Bacterial identification was performed with a matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry method (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany). Antibiotic susceptibility was determined by standard microdilution and Etest (bioMérieux), and interpreted according to EUCAST criteria. The screening for carbapenemase production included the MHT and combined-disc test using meropenem plus boronic acid or EDTA.⁷ Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) production was screened by double-disc synergy testing.⁷

Characterization of antibiotic resistance genes

Characterization of genes encoding carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA-48}) and ESBLs (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M}) was carried out by PCR and sequencing.^{7,8} *qnr* genes were sought by multiplex PCR.⁷

Transferability of *bla*_{KPC} and plasmid characterization

The transfer of KPC plasmids was assessed by filter mating using *E. coli* K-12 BM21 as the recipient.⁷ Transconjugants were selected on Luria–Bertani agar plates containing imipenem (0.5 mg/L), ceftazidime (2 mg/L) and rifampicin (100 mg/L). Plasmid DNA was extracted using a modified alkaline-lysis protocol,⁷ and the incompatibility group was determined using the PCR-based replicon typing scheme.⁹ The size of the KPC plasmids and the association with replicon type were confirmed by hybridization of S1 nuclease-digested genomic DNA from *E. coli* transconjugants (or wild-type strains in the absence of transfer) with appropriate probes.¹⁰ Similarity between the KPC plasmids was assessed by comparing EcoRI-, PstI- and HpaI-digested plasmid DNA profiles in all transconjugants.⁷

Clonal relatedness

Isolates were typed by PFGE of XbaI-digested DNA.⁷ *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates were also characterized by multilocus sequence typing (MLST) (see <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html> and <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>).

Results

Patients and bacterial isolates

Twenty-three patients were infected and/or colonized by KPC-producing Enterobacteriaceae isolates. The patients were mostly elderly (median age 72 years, range 24–86 years) with multiple underlying illnesses (Table 1). Infection was documented in eight cases, the most prevalent being intra-abdominal infection (Table 1). Nineteen patients were admitted to different wards and had a prolonged hospital stay (median 38 days, range 16–152 days). The median number of days between admission and the first positive culture with KPC-producing isolates was 23 (range 9–70 days). In the case of the remaining four patients, three were attended in the emergency room and one was an out-patient at the time of collection of the first positive sample. All of them had had a previous recent hospitalization in our institution. None of the patients had travelled abroad or been transferred from another hospital.

Overall, 98 KPC-producing Enterobacteriaceae isolates were identified (79 *K. pneumoniae*, 16 *E. coli* and 3 *E. cloacae*). In 15 patients, isolates were recovered either from multiple sites or consecutively from different samples. *K. pneumoniae* isolates were recovered from 20 patients either from clinical ($n=15$) or surveillance samples ($n=64$), while *E. coli* and *E. cloacae* were isolated only from surveillance sampling sites ($n=19$).

All Enterobacteriaceae consecutively recovered from the same patient exhibited indistinguishable PFGE profiles. Consequently, 24 enterobacterial isolates (20 *K. pneumoniae*, 2 *E. coli* and 2 *E. cloacae*) corresponding to the first isolate of each clone identified per patient were selected for further molecular studies.

Antimicrobial susceptibility and phenotypic carbapenemase detection

All isolates were resistant to penicillin/inhibitor combinations, extended-spectrum cephalosporins and aztreonam, but were susceptible to amikacin and colistin (MIC <2 mg/L) (Table 2). The MIC range of tigecycline was 0.25–2 mg/L (one isolate falling within the intermediate category). Carbapenem MICs varied from 0.25 mg/L to >32 mg/L (imipenem, MIC₅₀/MIC₉₀ 1/8 mg/L; meropenem, MIC₅₀/MIC₉₀ 0.75/6 mg/L; ertapenem, MIC₅₀/MIC₉₀ 1/4 mg/L). The MHT and the carbapenem/boronic acid combination disc test were positive for all isolates. The disc diffusion assay with EDTA was negative, as was that for ESBL detection.

Clonal relatedness and distribution over time

XbaI-PFGE identified six pulsotypes of *K. pneumoniae*, two of *E. coli* and one of *E. cloacae* (Table 2). MLST demonstrated that each *K. pneumoniae* PFGE type was associated with a different ST (ST11, ST20, ST384, ST454, ST659 and ST971). *K. pneumoniae* (Kpn)-A/ST384 and Kpn-G/ST659 (six isolates each) were the most frequently detected clones, followed by Kpn-F/ST454 (four isolates). With the exception of ST11, a single-locus variant of ST258, none of the *K. pneumoniae* belonged to the CG258 group.

The distribution of KPC-producing clones over time since the first detection of KPC in our institution in September 2009 is shown in Figure S1 (available as Supplementary data at JAC Online). Only three *K. pneumoniae* clones (Kpn-A/ST384, Kpn-F/ST454 and

Table 1. Characteristics of the patients infected and/or colonized by KPC-producing Enterobacteriaceae

Case no. ^a	Age (gender)	Hospital ward	Underlying diseases	LOS (days)	LOS until first positive culture (days)	First isolation site (date of isolation)	Bacterial species	Infection site	Colonization site
1	78 (F)	Vascular Surgery (7th floor)	diabetes mellitus	82	70	rectal (16 March 2010)	<i>E. coli</i>	not detected	rectal
2	33 (F)	Outpatient	breast carcinoma and sclerosing cholangitis	—	—	surgical drainage (22 March 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	not detected	wound
3	77 (F)	General Surgery-ICU (9th floor)	hiatus hernia	31	17	respiratory (24 March 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	respiratory tract and intra-abdominal infection	pharyngeal and rectal
4	63 (M)	General Surgery-ICU (9th floor)	intra-abdominal sepsis	29	11	rectal (31 March 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	not detected	pharyngeal and rectal
5	42 (M)	Gastroenterology (11th floor)	acute pancreatitis	43	29	rectal (6 May 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	not detected	rectal
6	36 (F)	Cardio-Paediatric-ICU (2nd floor)	congenital cardiopathy	31	22	rectal (29 June 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	not detected	rectal
7	24 (M)	Emergency	Crohn's disease	—	—	abscess (7 July 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	intra-abdominal infection	not detected
8	86 (F)	Internal Medicine (3rd floor)	diarrhoea	18	9	rectal (05 August 2010)	<i>E. cloacae</i>	not detected	rectal
9	72 (M)	Vascular Surgery (7th floor)	pulmonary carcinoma	16	16	rectal (09 August 2010)	<i>E. cloacae</i>	not detected	pharyngeal and rectal
10	78 (M)	Internal Medicine (3rd floor)	hepatocellular carcinoma	33	10	rectal (5 August 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	not detected	rectal
11	78 (M)	Oncology (3rd floor)	rectal adenocarcinoma	28	24	rectal (9 August 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	not detected	rectal
12	84 (M)	Internal Medicine (4th floor)	bronchiectasis and pneumonia	25	23	rectal (07 September 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	not detected	rectal
13	71 (F)	Internal Medicine-ICU (1st floor)	septic shock	125	45	wound (07 October 10) rectal (13 October 2010)	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	respiratory tract and surgical site infection not detected	pharyngeal and rectal pharyngeal and rectal
14	67 (M)	Internal Medicine-ICU (1st floor)	subarachnoid haemorrhage	152	15	rectal (11 October 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	not detected	pharyngeal and rectal
15	73 (M)	General Surgery-ICU (9th floor)	colon carcinoma	35	26	respiratory (25 October 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	respiratory tract infection	pharyngeal and rectal
16	75 (M)	General Surgery (11th floor)	rectal adenocarcinoma	69	55	respiratory (03 December 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	not detected	respiratory tract and rectal
17	65 (M)	General Surgery-ICU (9th floor)	caecal carcinoma	41	22	peritoneal fluid (13 December 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	intra-abdominal infection	not detected

Continued

Table 1. Continued

Case no. ^a	Age (gender)	Hospital ward	Underlying diseases	LOS (days)	LOS until first positive culture (days)	First isolation site (date of isolation)	Bacterial species	Infection site	Colonization site
18	72 (M)	Emergency	ulcerative colitis	—	—	rectal (16 December 2010)	<i>K. pneumoniae</i>	not detected	rectal
19	78 (M)	Traumatology (1st floor)	hip fracture	53	31	wound (31 December 10)	<i>K. pneumoniae</i>	not detected	rectal and wound
20	81 (F)	General Surgery (10th floor)	acute diverticulitis	100	70	blood (13 June 2011)	<i>K. pneumoniae</i>	catheter-related bloodstream infection	rectal
21	84 (F)	General Surgery (11th floor)	coecal carcinoma	65	32	abscess (17 June 2011)	<i>K. pneumoniae</i>	intra-abdominal infection	not detected
22	71 (M)	Emergency	necrotizing vasculitis	—	—	wound (22 June 2011)	<i>K. pneumoniae</i>	surgical site infection	pharyngeal and rectal
23	45 (F)	Nephrology (7th floor)	kidney transplant	21	21	rectal (31 October 2011)	<i>K. pneumoniae</i>	not detected	rectal

^aCases are numbered in chronological order. In Case 13, the patient was infected by a KPC-3-producing *K. pneumoniae* and simultaneously colonized by a KPC-3-producing *K. pneumoniae* and a KPC-3-producing *E. coli*. ICU, intensive care unit; LOS, length of stay.

Kpn-G/ST659) were found during more than a 1 month period, while other clones were only occasionally detected.

Molecular characterization of antibiotic resistance genes and plasmids

The presence of *bla*_{KPC-3} was demonstrated in five *K. pneumoniae* and in one *E. coli* clone (Eco-I/ST357) (Table 2). The remaining *K. pneumoniae* (Kpn-E/ST20), *E. coli* (Eco-C/ST224) and *E. cloacae* (Eclo-H) clones harboured *bla*_{KPC-2}. None of the clones harboured *bla*_{ESBL}, other *bla*_{carbapenemase} or *qnr* genes.

The *bla*_{KPC-3} gene was only transferable for isolates belonging to three *K. pneumoniae* clones (Kpn-F/ST454, Kpn-G/ST659 and Kpn-J/ST971) and one *E. coli* clone (Eco-I/ST357). In these clones, *bla*_{KPC-3} was located on an ~100 kb plasmid showing a highly similar restriction fragment length polymorphism (RFLP) pattern in all transconjugants (Table 2). The nucleotide sequence of these replicons was 99% identical to those of pKpQIL-IT and pKpQIL plasmids (GenBank accession numbers JN233705 and GU595196), which belong to the FII_K group. This plasmid was identified in one *K. pneumoniae* clone (Kpn-G/ST659) and one *E. coli* clone (Eco-I/ST357), which were sequentially recovered in the same patient (Table 2). On the other hand, *bla*_{KPC-3} was located on non-transferable ~100 kb IncFII_K and ~40 kb IncN plasmids in Kpn-A/ST384 and Kpn-D/ST11 clones, respectively. The *bla*_{KPC-2} gene was associated with non-typeable and non-transferable ~20 kb plasmids (Table 2).

Discussion

The epidemiology of KPC producers has been mainly associated with the global expansion of multidrug-resistant *K. pneumoniae* ST258 and the dissemination of plasmids of different incompatibility groups.^{3,4} The most remarkable finding from our local epidemiology is that the most prevalent KPC-*K. pneumoniae* clones (ST384, ST454 and ST659) have not been previously linked with KPC production and are not clustered with any of the high-risk clones previously associated with these enzymes.³ In the USA and Israel, where KPC *K. pneumoniae* ST258 is already endemic, the later dissemination of *bla*_{KPC} genes was also associated with non-epidemic genetic lineages.^{5,6} In Spain, the prevalence of KPC is still low since most of the carbapenemases identified are VIM and more recently OXA-48.^{2,11}

In this scenario, *bla*_{KPC-3} genes emerged in genetic lineages that were probably circulating as part of our local clonal pool. This was in fact the case for Kpn-ST388, which was found in 2009 in our hospital carrying *bla*_{KPC-3} and *bla*_{CTX-M-10}, but had been present since 1998 only carrying *bla*_{CTX-M-10}.⁷ However, we occasionally found ST11, a single-locus variant of ST258, which is also a worldwide-spread clone, but linked to different predominant β-lactamase genes such as *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} and, recently, *bla*_{OXA-48}.^{2,4,12-14} In our institution, ST11 was not associated with either ESBL or VIM producers prior to the detection of isolates carrying *bla*_{OXA-48} during 2012 (D. Gijón, unpublished results). These observations suggest that the spread of the so-called high-risk clones might be constrained by the local populations of *K. pneumoniae*.

Table 2. Characteristics of the KPC-producing enterobacterial clones

Bacterial species (no.)	PFGE type/ST	Case no.	<i>bla</i> _{KPC}	Plasmids ^a		Co-resistance profile ^b
				size (kb)	Inc group	
<i>K. pneumoniae</i> (n=20)	Kpn-A/ST384	15, 16, 17, 20, 21, 22	KPC-3	~100	FII _K	(CIP), (TGC) ^c
	Kpn-D/ST11	2	KPC-3	~40	N	GEN, TOB, CIP, SXT, FOS
	Kpn-E/ST20	3, 4	KPC-2	~20	NT	—
	Kpn-F/ST454	5, 7, 10, 11	KPC-3	~100	FII _K	CIP, SXT, FOS
	Kpn-G/ST659	6, 12, 13, 14, 18, 19	KPC-3	~100	FII _K	CIP, MIN, (FOS)
	Kpn-J/ST971	23	KPC-3	~100	FII _K	CIP
<i>E. coli</i> (n=2)	Eco-C/ST224	1	KPC-2	~20	NT	CIP, FOS
	Eco-I/ST357	13	KPC-3	~100	FII _K	—
<i>E. cloacae</i> (n=2)	Eclo-H	8, 9	KPC-2	~20	NT	CIP, (FOS)

NT, non-typeable.

^aPlasmids from Kpn-F/ST454, Kpn-G/ST659, Kpn-J/ST971 and Eco-I/ST357 clones were transferred by conjugation and showed a similar RFLP pattern. The others were non-transferable plasmids. Clones Kpn-G/ST659 and Eco-I/ST357 were sequentially recovered in case 13 and harboured the same Inc FII_K plasmid.

^bParentheses indicate that not all isolates studied showed a resistance phenotype. CIP, ciprofloxacin; FOS, fosfomycin; GEN, gentamicin; MIN, minocycline; TGC, tigecycline; TOB, tobramycin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole.

^cOne isolate presented an MIC of 2 mg/L, which corresponds to intermediate susceptibility.

In addition to the successful clones, previous studies have demonstrated that the spread of KPC genes is also linked to Tn4401 and different types of transferable IncF(k), IncL/M and IncX plasmids.^{4,12,15} We reported the recovery of conjugative ~100 kb IncFII_K plasmids exhibiting the same RFLP pattern from *K. pneumoniae* and *E. coli* clones. IncFII_K plasmids have greatly contributed to the spread of antibiotic resistance genes such as *bla*_{CTX-M-15} or *bla*_{KPC} among *K. pneumoniae*, but they also have the ability to transfer between other enterobacterial species.^{16,17} *bla*_{KPC}-harbouring IncFII_K plasmids have been mainly described in *K. pneumoniae* ST258 in different countries including Israel, Italy, Poland, Greece and the USA.^{12,17–19}

The results of our work demonstrated, as in other studies, that IncFII_K plasmids harbouring *bla*_{KPC} genes were not restricted to ST258 clones.^{12,17} Although the *in vitro* conjugative efficiency of this IncFII_K plasmid was low (data not shown), we identified the same plasmid in a *K. pneumoniae* (Kpn-G/ST659) and in an *E. coli* (Eco-I/ST357) clone sequentially recovered from the same patient, suggesting an *in vivo* plasmid transfer. This phenomenon has previously been reported involving the transfer of a KPC-3-encoding IncFII_K plasmid from *K. pneumoniae* ST258 to *E. coli*, which might act as an accidental recipient present in patients' microbiota.²⁰ In this sense, the intestinal tract of colonized patients might play an important role in the clonal dissemination and horizontal transfer of genetic platforms between multiple *K. pneumoniae* clones (not only ST258) and other species, thus favouring the ecological adaptation and persistence of KPC genes in the hospital and the surrounding nosocomial environment.

In summary, we have described the rapid penetration of *bla*_{KPC} genes to different unrelated *K. pneumoniae* clones in the absence of the classic epidemic *K. pneumoniae* ST258 high-risk clone. These findings highlight the importance of horizontal gene transfer in the dissemination of *bla*_{KPC} genes and the role of the local clonal pool as potential substrate for the acquisition of these genes.

Funding

This work was supported by research grants from the European Commission (TROCAR-FP7-HEALTH-F3-2008-223031, R-GNOSIS-FP7-HEALTH-F3-2011-282512, EvoTAR- FP7-HEALTH-F3-2011-282004) and by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, Spain—co-financed by the European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' ERDF, the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015). P. R.-G. is currently supported by a research contract from the European Commission (R-GNOSIS-FP7-HEALTH-F3-2011-282512). T. C. is supported by a fellow research contract grant FIO9/00901 and A. V. by a post-doctoral contract 'Juan de la Cierva'—both contracts from the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto Carlos III, Spain.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Figure S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

References

- 1 Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 1791–8.
- 2 Cantón R, Akova M, Carmeli Y et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 413–31.
- 3 Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; **35**: 736–55.

- 4 Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC et al. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3579–83.
- 5 Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I et al. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 3002–6.
- 6 Kitchel B, Sundin DR, Patel JB. Regional dissemination of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 4511–3.
- 7 Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P et al. Emergence of *bla*_{KPC-3}-Tn4401 associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1608–14.
- 8 Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **70**: 119–23.
- 9 Carattoli A, Bertini A, Villa L et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; **63**: 219–28.
- 10 Sambrook J, Frisch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 11 Paño-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San Francisco C et al. Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 89–96.
- 12 Baraniak A, Grabowska A, Izdebski R et al. Molecular characteristics of KPC-producing Enterobacteriaceae at the early stage of their dissemination in Poland, 2008–2009. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 5493–9.
- 13 Damjanova I, Tóth A, Pászti J et al. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005—the new ‘MRSAs’? *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**: 978–85.
- 14 Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K et al. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 84–8.
- 15 Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in *bla*_{KPC} gene mobilization. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 5370–3.
- 16 Dolejska M, Brhelova E, Dobiasova H et al. Dissemination of IncFII(K)-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from children in hospital paediatric oncology wards. *Int J Antimicrob Agents* 2012; **40**: 510–5.
- 17 Mavroidi A, Miriagou V, Malli E et al. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 410 (ST410) with KPC-2 β -lactamase. *Int J Antimicrob Agents* 2012; **39**: 247–50.
- 18 García-Fernández A, Villa L, Carta C et al. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 2143–5.
- 19 Leavitt A, Chmelnitsky I, Carmeli Y et al. Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4493–6.
- 20 Goren MG, Carmeli Y, Schwaber MJ et al. Transfer of carbapenem-resistant plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in patient. *Emerg Infect Dis* 2010; **16**: 1014–7.

Evaluation of the eazyplex[®] SuperBug CRE system for rapid detection of carbapenemases and ESBLs in clinical Enterobacteriaceae isolates recovered at two Spanish hospitals

Sergio García-Fernández¹, María-Isabel Morosini^{1,2*}, Francesc Marco^{3,4}, Desirée Gijón^{1,2}, Andrea Vergara^{3,4}, Jordi Vila^{3,4}, Patricia Ruiz-Garbajosa^{1,2} and Rafael Cantón^{1,2}

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; ²Red Española de Investigación en Patología Infecciosa, Madrid, Spain; ³Department of Clinical Microbiology, CDB, Hospital Clínic, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁴Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Barcelona, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-91-3368330; E-mail: mariaisabel.morosini@salud.madrid.org

Received 29 July 2014; returned 25 September 2014; revised 27 October 2014; accepted 30 October 2014

Objectives: To evaluate the performance of the eazyplex[®] SuperBug CRE system, a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based system, for confirming the presence of carbapenemases in addition to CTX-M-type ESBLs in previously genotypically and/or phenotypically characterized clinical Enterobacteriaceae isolates recovered in two centres in Spain.

Methods: A collection of 94 carbapenemase-producing strains previously characterized by conventional PCR and sequencing and a total of 45 prospectively collected isolates with phenotypes compatible with the presence of a carbapenemase were tested with the eazyplex[®] SuperBug CRE system. In both cases, the presence of an ESBL was also assessed. Results were evaluated to establish the accuracy of this rapid LAMP-based system as well as to determine the concordance between all approaches.

Results: The eazyplex[®] SuperBug CRE system correctly detected *bla* carbapenemase genes with or without *bla*_{CTX-M} genes in 100% of the molecularly characterized strains. Absolute concordance (100%) was also observed in the case of isolates with phenotypes compatible with the presence of a carbapenemase with or without an ESBL inferred by susceptibility patterns and phenotypic inhibitory profiles. Determinations performed with the eazyplex[®] SuperBug CRE system took 15 min.

Conclusions: The eazyplex[®] SuperBug CRE system proved to be a powerful tool for the detection of different carbapenemases as well as CTX-M-type ESBLs in Enterobacteriaceae with a rapid resolution time. The test has the high-performance parameters attributable to the sensitivity and specificity already demonstrated by LAMP-based assays. These results assure the usefulness of this test for routine rapid confirmation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.

Keywords: isothermal amplification, β -lactamases, LAMP

Introduction

The emergence and subsequent wide dissemination of a variety of bacterial species producing acquired carbapenemases encoded by transmissible plasmids are responsible for an unprecedented public healthcare threat of global dimensions.^{1,2} Rapid detection of these types of isolates, capable of efficaciously colonizing and/or infecting both community and in-hospital patients, is essential to implement containment measures to prevent and limit the

spread of carbapenemase producers.³ This detection is complex due to the increasing diversity of carbapenemase enzymes with variable expression rendering different phenotypes.^{4,5}

The aim of this study was to evaluate the performance of the eazyplex[®] SuperBug CRE system using: (i) a collection of genotypically characterized carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) isolates; and (ii) a group of contemporary clinical isolates with a carbapenemase-producer phenotype prospectively collected in two Spanish hospitals.

Materials and methods

The eazyplex® SuperBug CRE system (Amplex Biosystems GmbH, Giessen, Germany) is a qualitative genotypic diagnostic test, consisting of a freeze-dried, ready-to-use mixture for an isothermal amplification reaction that covers carbapenemase variants of the VIM (-1 to -37), NDM (-1 to -7) and KPC (-2 to -15) families, part of the OXA-48 family (-48, -162, -204 and -244; excluding OXA-181) and the CTX-M-1 and CTX-M-9 ESBL families from Gram-negative bacteria. Amplification products that are generated by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) are visualized by real-time fluorescence measurement of a fluorescent dye bound to double-stranded DNA using the GENIE® II (OptiGene, Horsham, UK) instrument.⁶

Table 1. Characteristics of the 94 Enterobacteriaceae isolates with characterized carbapenemase-mediated resistance mechanisms with or without ESBL-mediated resistance mechanisms

Resistance mechanisms	Microorganisms (no. of isolates)
KPC-2	<i>K. pneumoniae</i> (2), <i>Enterobacter cloacae</i> (2), <i>E. coli</i> (1)
KPC-3	<i>K. pneumoniae</i> (22), <i>E. cloacae</i> (1), <i>E. coli</i> (2)
KPC-3 + CTX-M-15	<i>K. pneumoniae</i> (1)
VIM-1	<i>K. pneumoniae</i> (2), <i>Klebsiella oxytoca</i> (1), <i>E. coli</i> (2), <i>E. cloacae</i> (3), <i>Citrobacter freundii</i> (1), <i>Serratia marcescens</i> (2), <i>Raoultella ornithinolytica</i> (1)
VIM-1 + CTX-M-10	<i>K. oxytoca</i> (1)
VIM-1 + CTX-M-15	<i>K. pneumoniae</i> (1), <i>K. oxytoca</i> (1)
VIM-1 + CTX-M-32	<i>E. coli</i> (1)
VIM-1 + CTX-M-14	<i>K. oxytoca</i> (1)
NDM-1	<i>Providencia rettgeri</i> (1)
NDM-5	<i>E. coli</i> (1)
OXA-48	<i>K. pneumoniae</i> (3), <i>K. oxytoca</i> (1), <i>E. coli</i> (2), <i>E. cloacae</i> (1), <i>Citrobacter koseri</i> (1), <i>Citrobacter braakii</i> (1)
OXA-48 + CTX-M-15	<i>K. pneumoniae</i> (30), <i>E. coli</i> (2), <i>Enterobacter aerogenes</i> (1), <i>Citrobacter amalonaticus</i> (1)
OXA-48 + CTX-M-14	<i>E. coli</i> (1)

Detection of carbapenemase and ESBL genes, which takes 15 min, is performed for Gram-negative single bacterial colonies according to the manufacturer's instructions (<http://www.hyplex.de>).

In this study, all tested isolates were Enterobacteriaceae recovered at the microbiology laboratories of the Ramón y Cajal University Hospital (Madrid, Spain) and the Clinic University Hospital (Barcelona, Spain). A collection (2009–13) of 94 strains with carbapenemase genes previously characterized at the molecular level, with or without concomitant ESBL genetic determinants, was included (Table 1). Molecular typing was performed by conventional PCR assays and sequencing according to previously published studies.^{7–9} Additionally, a total of 45 prospectively collected routine clinical isolates (February–June 2014) with phenotypic resistance compatible with the presence of a carbapenemase, with or without an ESBL, were also tested (Table 2). In this latter group, the first approach towards the possible presence of a carbapenemase was inferred from the β-lactam MIC profiles obtained with the MicroScan System (Siemens, West Sacramento, CA, USA) or the Phoenix System (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) considering the updated EUCAST clinical breakpoints and the corresponding guidelines for detection of these organisms.^{10,11} These isolates were then submitted to the eazyplex® SuperBug CRE system test and, simultaneously, to assessment of the inhibition-based profile using the ROSCO KPC/Metallo-β-lactamase and OXA-48 Confirm Kit (ROSCO Diagnostica, Taastrup, Denmark) and the modified Hodge test (MHT).¹² Detection of ESBLs was performed by the double-disc synergy test.¹³ *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 (KPC-2 producer) were used as negative and positive controls, respectively. Genetic relatedness among the most numerous *K. pneumoniae* subgroups was previously determined.^{9,14}

Results and discussion

Considering the collection of genotypically characterized CPE isolates, 100% agreement was observed between PCR and sequencing and the eazyplex® SuperBug CRE system results (Table 1). Again, when analysing contemporary isolates, 100% concordant results were found between both the inferred phenotype and the eazyplex® SuperBug CRE system results (Table 2). Moreover, full consistency was observed with the carbapenemase inhibition profile given by specific ROSCO tablets and the MHT when combining both test results. Furthermore, the double-disc synergy test was sensitive enough to confirm the presence of an ESBL when coexpressed with a carbapenemase. Cycle threshold (Ct) values

Table 2. Contemporary clinical Enterobacteriaceae isolates: compared performance between the eazyplex® SuperBug CRE system and the inferred resistance phenotype

Phenotypically inferred resistance mechanisms (no. of isolates)	Microorganisms (no. of isolates)	Resistance mechanisms identified by the eazyplex® SuperBug CRE system (no. of isolates)
Class A carbapenemase (1)	<i>E. cloacae</i> (1)	KPC (1)
MBL (9)	<i>K. pneumoniae</i> (2), <i>K. oxytoca</i> (1), <i>E. cloacae</i> (4), <i>E. aerogenes</i> (1), <i>C. freundii</i> (1)	VIM (9)
MBL + ESBL (2)	<i>E. coli</i> (1), <i>E. cloacae</i> (1)	VIM + CTX-M-1-group (2)
OXA-48 family (8)	<i>K. pneumoniae</i> (3), <i>E. coli</i> (3), <i>C. freundii</i> (1), <i>R. ornithinolytica</i> (1)	OXA-48 (8)
OXA-48 family + ESBL (22)	<i>K. pneumoniae</i> (21), <i>E. coli</i> (1)	OXA-48 + CTX-M-1-group (22)
OXA-48 family + ESBL (3)	<i>Kluyvera ascorbata</i> (2), <i>E. coli</i> (1)	OXA-48 + CTX-M-9-group (3)

MBL, metallo-β-lactamase.

(minutes:seconds) for the genes detected by the eazyplex® SuperBug CRE system ranged from 4:00 to 7:00 for the VIM group, from 4:45 to 8:00 for the OXA-48 group, from 5:15 to 9:45 for the KPC group, from 3:45 to 7:30 for the CTX-M group and from 4:00 to 4:45 for the NDM group; the range was 6:00–10:45 for the internal control amplification. A limitation of our study was the lack of isolates expressing more than one carbapenemase simultaneously, which made this aspect untestable, although this epidemiological feature is still infrequent in Spain.^{14–16} Interestingly, high-risk clones currently circulating in Spain were observed. Overall, the KPC-3-producing *K. pneumoniae* isolates included ST384, ST659 and ST454, while ST20, ST11 and ST971 were less represented. Moreover, among the *K. pneumoniae* isolates harbouring OXA-48+CTX-M-1-group, two dominant clones were represented: ST11 and ST405.

Infected patients with CPE have increased mortality rates and thus require timely and rapidly efficacious treatment.¹⁷ Moreover, colonization with these types of isolates requires rapid detection to prevent and limit their dissemination in the hospital environment. It has been recently stressed that the control of their spread is still possible and mainly relies on the use of rapid diagnostic techniques and strict implementation of hygiene measures.³ The availability of a rapid test for confirming the presence of such resistance determinants is also essential to expedite therapeutic decision making. However, heterogeneous expression of carbapenemases and complex phenotypes may hamper laboratory detection by conventional phenotypic confirmatory tests including automated antimicrobial susceptibility systems, even with updated carbapenem breakpoint values. Moreover, in many cases, long response times with these methods as well as with conventional PCR techniques may not be clinically useful, particularly in the case of severely ill patients. The eazyplex® SuperBug CRE system demonstrated high versatility and accuracy for the rapid detection of isolates harbouring various carbapenemase resistance determinants. It is of note that the ample spectrum of genes and gene variants included in this system reflects those mostly prevalent worldwide. Other rapid tests have also been implemented, including colorimetric assays such as the Carba NP test and the Blue-Carba test (ROSCO Diagnostica).^{18,19} Although they have been coupled with the use of β -lactamase inhibitors for the discrimination of carbapenemase types, they still have lower discriminative capacity than that observed in our study.^{20,21} Moreover, false negative results have been observed with such colorimetric tests with some mucoid isolates, especially isolates with low carbapenemase activity, particularly OXA-48-like producers.²¹

In summary, the eazyplex® SuperBug CRE system represents a promising platform with optimal sensitivity for the rapid detection of many of the most prevalent carbapenemase and ESBL genes among clinical CPE and should be considered for routine use. Future cost-effectiveness studies should also be performed to demonstrate the system's usefulness for rapid implementation of control measures and therapeutic decision making.

Funding

This study was supported by Amplex BioSystems GmbH and Menarini Diagnostics S.A., the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, cofinanced by European Regional Development Fund

(ERDF) 'A Way to Achieve Europe', the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), the Spanish Ministry of Health (grant number FIS 11/02024) and the European Commission (grants R-GNOSIS-FP7-HEALTH-F3-2011-282512, SATURN-FP7-HEALTH-F3-2009241796). This study was also supported by grant 2014SGR653 from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació, of the Generalitat de Catalunya, Spain. D. G. was supported by a Río Hortega postdoctoral contract from the Instituto de Salud Carlos III of Spain.

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Cantón R, Akova M, Carmeli Y et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 413–31.
- 2 Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012; **25**: 682–707.
- 3 Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 821–30.
- 4 Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 839–53.
- 5 Nordmann P, Gniadowski M, Giske CG et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 432–8.
- 6 Solanki R, Vanjari L, Ede N et al. Evaluation of LAMP assay using phenotypic tests and conventional PCR for detection of *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC} genes among carbapenem-resistant clinical Gram-negative isolates. *J Med Microbiol* 2013; **62**: 1540–4.
- 7 Pitart C, Solé M, Roca I et al. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4398–401.
- 8 Solé M, Pitart C, Roca I et al. First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4402–4.
- 9 Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M et al. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 2487–92.
- 10 EUCAST. *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 4.0*. 2014. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf.
- 11 Giske GC, Martínez-Martínez L, Cantón R et al. *EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance*. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf.
- 12 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth Informational Supplement M100-S24*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2014.
- 13 Drieux L, Brossier F, Sougakoff W et al. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14** Suppl 1: 90–103.

- 14** Gijón D, Morosini MI, García-Fernández S *et al.* Multiclonal spread of OXA-48 producers including CG258 (ST11) *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae in a VIM and KPC carbapenemase-endemic hospital and emergence in non-hospitalized patients. In: *Abstracts of the Twenty-fourth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 2014*. Abstract P-1088. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Basel, Switzerland.
- 15** Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J *et al.* The threat of the carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain: positioning report of the SEIMC study groups, GEIH and GEMARA. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; doi:10.1016/j.eimc.2014.02.011.
- 16** Porres-Osante N, Azcona-Gutiérrez JM, Rojo-Bezares B *et al.* Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1792–5.
- 17** Akova M, Daikos GL, Tzouveleakis L *et al.* Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 439–48.
- 18** Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: 1503–7.
- 19** Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 4281–3.
- 20** Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 6437–40.
- 21** Tijet N, Boyd D, Patel SN *et al.* Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 4578–80.

Detection of Carbapenemase Production in a Collection of *Enterobacteriaceae* with Characterized Resistance Mechanisms from Clinical and Environmental Origins by Use of Both Carba NP and Blue-Carba Tests

Sergio García-Fernández,^a María-Isabel Morosini,^{a,b} Desirée Gijón,^{a,b} Lorena Beatobe,^a Patricia Ruiz-Garbajosa,^{a,b} Lucas Domínguez,^c Rafael Cantón,^{a,b} Aránzazu Valverde^{a,c}

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain^a; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa, Madrid, Spain^b; Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain^c

Rapid-screening methods to confirm the presence of resistance mechanisms in multidrug-resistant bacteria are currently recommended. Carba NP and Blue-Carba tests were evaluated in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from hospital ($n = 102$) and environmental ($n = 57$) origins for detecting the different molecular classes among them. Both methods showed to be fast and cost-effective, with high sensitivity (98% to 100%) and specificity (100%), and may be easily introduced in the routine laboratory.

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) constitute a critical medical and public health issue (1). Moreover, plasmids responsible for carbapenemase transmission could carry other resistance mechanisms, making the antibiotic choice for the treatment of infections caused by these isolates very limited (2, 3). Rapid identification of these isolates colonizing or infecting patients is crucial to improve infection control measures with adequate antibiotic therapy and to minimize the spread of these resistant microorganisms. The variable hydrolysis spectrum of carbapenemases and the simultaneous presence of other β -lactam resistance mechanisms usually make their identification difficult (4).

Colorimetric methods to detect carbapenemase production directly in bacterial isolates recovered from microbiological cultures are easy to perform and reliable enough to be used in routine laboratory work. They are based on the enzymatic hydrolysis of the β -lactam ring of a carbapenem (usually imipenem) causing the acidification of an indicator solution (namely phenol red for Carba NP, pH 7.8, or bromothymol blue for Blue-Carba, pH 7.0, respectively) that changes its color due to pH modification. Detection of CPE takes a maximum of 2 h according to described protocols (5, 6).

In this study, we evaluated the performance of two different colorimetric methods to detect CPE: the Carba NP (5) and the Blue-Carba (6) tests. Both tests, using in-house prepared indicator solutions and imipenem, were performed in a 96-well tray format first and/or in 1.5-ml Eppendorf tubes. It should be emphasized that indicator solutions require strict adjustment of pH and addition of the carbapenem immediately before using. Studied isolates ($n = 229$) included (i) CPE from various clinical samples ($n = 102$) recovered at the Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, Spain), (ii) CPE from environmental samples (sewage waters, $n = 57$) from the Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET; Madrid, Spain), and (iii) noncarbapenemase producers (NCPE, $n = 70$) (either susceptible or nonsusceptible to carbapenems) from various clinical sources ($n = 48$) and from sewage water ($n = 22$). This group included wild-type isolates ($n = 34$), extended-spectrum β -lactamases (ESBL) (TEM, SHV, CTX,

and OXA variants; $n = 11$), and AmpC (chromosomally encoded or plasmid-mediated) β -lactamase producers either associated or not with porin loss ($n = 25$). *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 (a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2 [KPC-2] producer) were used as controls. Isolate identification was confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

A preliminary detection and/or confirmation of the presence of a carbapenemase was assessed with the modified Hodge test (MHT) (7). MICs (of imipenem, ertapenem, and meropenem) were determined using gradient strips (MIC test strip; Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy). EUCAST clinical breakpoints and the screening cutoff values for CPE were considered (8, 9). The characterization of carbapenemase genes was performed by conventional PCR assays and sequencing, as previously published (10–12). Carba NP and Blue-Carba tests were simultaneously performed in duplicate (2 separate days) in all strains, following previously published instructions. Two independent readers interpreted the results (5, 6). When equivocal results were obtained, testing were repeated and included the following modifications: (i) for the Carba NP test, the volume of lysis buffer was increased (200 μ l instead of 100 μ l) and (ii) for the Blue-Carba test, a 10 μ l-loop full of pure culture instead of a 5 μ l-loop was used.

Received 23 September 2015 Returned for modification 19 October 2015
Accepted 18 November 2015

Accepted manuscript posted online 25 November 2015

Citation García-Fernández S, Morosini M-I, Gijón D, Beatobe L, Ruiz-Garbajosa P, Domínguez L, Cantón R, Valverde A. 2016. Detection of carbapenemase production in a collection of *Enterobacteriaceae* with characterized resistance mechanisms from clinical and environmental origins by use of both Carba NP and Blue-Carba tests. J Clin Microbiol 54:464–466. doi:10.1128/JCM.02580-15.

Editor: P. Bourbeau

Address correspondence to María-Isabel Morosini, mariaisabel.morosini@salud.madrid.org.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

TABLE 1 Activity of carbapenems, MHT results, and Carba NP and Blue-Carba performances against the 159 carbapenemase-producing isolates

Carbapenemase (<i>n</i>)	Microorganism (<i>n</i>)	MIC (μg/ml) ^a of:			No. of positive results for:		
		IMP	MEM	ERT	MHT	Carba NP	Blue-Carba
Class A							
KPC-2 (45)	<i>Citrobacter freundii</i> complex (15)	0.38 to >32	0.5 to >32	0.5 to >32	14 ^b	14	14
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (11)	0.75 to >32	0.75 to >32	1 to >32	11	11	11
	<i>E. coli</i> (2)	0.5 to 6	1 to 8	1.5 to 2	2	2	2
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (5)	0.75 to 4	0.38 to 2	0.75 to 4	4 ^c	5	5
	<i>K. pneumoniae</i> (3)	4 to 12	4 to 12	6 to 8	3	3	3
	<i>Kluyvera ascorbata</i> (1)	12	12	6	1	1	1
	<i>Kluyvera cryocrescens</i> (1)	4	4	2	1	1	1
	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (7)	0.25 to 12	1.5 to 24	1.5 to 4	7	7	7
	KPC-3 (36)	<i>Citrobacter freundii</i> complex (2)	4 to 8	2 to 6	4 to 16	2	2
<i>Enterobacter cloacae</i> complex (2)		0.5 to 0.75	0.25 to 1	0.38 to 2	2	2	2
<i>E. coli</i> (2)		1	0.38	0.25 to 0.5	2	2	2
<i>K. pneumoniae</i> (28)		0.25 to 6	0.38 to 12	0.19 to 12	28	28	28
<i>Kluyvera ascorbata</i> (2)		12 to >32	8 to >32	4 to >32	2	2	2
Class B							
VIM-1 (24)	<i>Citrobacter freundii</i> complex (3)	0.75 to 8	0.5 to 6	1 to 4	3	3	3
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (7)	1 to 3	0.25 to 8	0.25 to 12	7	7	7
	<i>E. coli</i> (1)	0.5	0.75	1	1	1	1
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (4)	0.38 to 2	0.25 to 1	0.047 to 0.5	4	4	4
	<i>K. pneumoniae</i> (5)	1 to 6	0.5 to 3	0.125 to 1	4 ^c	5	5
	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (2)	1.5 to >32	0.5 to >32	1.5 to >32	2	2	2
	<i>Serratia marcescens</i> (2)	1.5 to 2	0.38	0.19 to 0.25	2	2	2
NDM-1 (1)	<i>K. pneumoniae</i>	>32	>32	>32	1	1	1
Class D							
OXA-48 (53)	<i>Citrobacter amalonaticus</i> (1)	2	0.19	0.25	1	1	1
	<i>Citrobacter freundii</i> complex (2)	0.5 to 2	0.25 to 0.38	0.38	2	2	2
	<i>Citrobacter koseri</i> (1)	0.38	0.125	0.25	1	1	1
	<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)	1	1	6	1	1	0 ^d
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (1)	0.75	0.25	1.5	1	1	1
	<i>E. coli</i> (6)	0.19 to 4	0.125 to 1	0.25 to 6	6	6	6
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	0.5	0.25	0.75	1	1	1
	<i>K. pneumoniae</i> (37)	0.25 to >32	0.125 to >32	0.75 to >32	34 ^{c,e}	37	35 ^d
	<i>Kluyvera ascorbata</i> (2)	0.5 to 0.75	0.38 to 0.5	0.75 to 1.5	2	2	2
	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (1)	1	0.38	0.75	1	1	1

^a IMP, imipenem; MEM, meropenem; ERT, ertapenem.^b +, positive result.^c MHT equivocal results: $n = 1$ *Klebsiella oxytoca* KPC-2 + CTX-M-15; $n = 1$ *K. pneumoniae* VIM-1; $n = 1$ *K. pneumoniae* OXA-48 + CTX-M-15; $n = 1$ *K. pneumoniae* OXA-48 + SHV.^d Blue-Carba false negatives: $n = 2$ *K. pneumoniae* OXA-48 + CTX-M-15; $n = 1$ *E. aerogenes* OXA-48 + CTX-M-15.^e MHT negative result: $n = 1$ *K. pneumoniae* OXA-48 + CTX-M-15.

The collection of 229 *Enterobacteriaceae* isolates included *Klebsiella* spp. ($n = 99$), *E. coli* ($n = 49$), *Enterobacter* spp. ($n = 34$), *Citrobacter* spp. ($n = 25$), *Raoultella ornithinolytica* ($n = 14$), *Kluyvera* spp. ($n = 6$), and *Serratia marcescens* ($n = 2$).

The 159 CPE comprised the following variants: OXA-48 ($n = 53$), KPC-2 ($n = 45$), KPC-3 ($n = 36$), VIM-1 ($n = 24$), and NDM-1 ($n = 1$) (Table 1). MHT detected 96.9% (154/159) of CPE. In 8 and 6 isolates of the 159 CPE, ambiguous or false-negative results were obtained with the Blue-Carba test and the Carba NP test, respectively. Finally, after applying the above-cited modifications, a positive result was obtained in all CPE when using the Carba NP test (100% sensitivity). With the Blue-Carba test, 156 of 159 isolates were correctly detected; thus, sensitivity and negative-predictive results were slightly lower, at 98% and 96%, respectively. Blue-Carba detected 100% of KPC, VIM, and NDM enzymes and 94% of OXA-48 enzymes. The 3 OXA-48-

producing isolates ($n = 2$, *K. pneumoniae*; $n = 1$, *Enterobacter aerogenes*) with negative results with the Blue-Carba test had hypermucooid phenotypes. Negative results were obtained for all NCPE with both methods, which means specificity and positive predictive values were 100%. Reader results were consistent with each other in all experiments. The carbapenem MICs (in $\mu\text{g/ml}$) in the NCPE ranged from 0.094 to 0.38 (imipenem), 0.016 to 16 (meropenem), and 0.25 to 4 (ertapenem), and environmental isolates were more resistant than clinical ones (data not shown).

These results confirmed that the Carba NP and Blue-Carba tests are both adequate for the detection of CPE from clinical origin (5). In addition, we demonstrated an adequate performance with CPE from environmental origin. We also noted that unreliable test results when using 96-well microtiter plates could be obtained, as the negative-control exhibited a change to positive color. This could be produced by bacterial components, water

condensation, or interaction with the atmosphere affecting the pH of the solution. This aspect was solved by repeating the assay using 1.5-ml Eppendorf tubes, and no more discrepancies were observed (13). A limitation of both tests is that the in-house indicator solution, simultaneously including imipenem as the substrate, has to be prepared at the time of use to avoid spontaneous degradation of the antibiotic.

Interestingly, when using both methods, it is possible to suspect the type of carbapenemase by attending to the time required to produce the indicator's acidification. Usually, KPC producers required less than 30 min, NDM and VIM producers required less than 1 h, and OXA producers required more than 1 h. Some isolates not producing a clear color change caused indeterminate or false-negative results, particularly those with a low carbapenemase activity, like OXA-48 producers (14), or those with mucoid phenotypes (15). Fortunately, in the case of these conflicting isolates, the stated modifications solved discrepant results. No misidentifications were observed in class A/class B carbapenemase producers, as described previously (15, 16).

Although the Blue-Carba test showed a slightly lower sensitivity than the Carba NP test, Blue-Carba is a simpler test, as a first bacterial protein extraction step is not required, allowing the direct use of colonies. Moreover, the cost of the Blue-Carba test is low, as no extraction buffer is required.

Despite the heterogeneous expression of carbapenemases (MIC range, 0.5 to >32 µg/ml), both methods were able to properly identify CPE. No false positives were observed in isolates in which carbapenem MICs were affected, as was the case of AmpC overproducers and/or ESBL producers coupled with porin loss (17, 18).

In conclusion, both colorimetric tests can be incorporated into the routine workflow of the clinical microbiology laboratory, allowing the rapid and somewhat inexpensive detection of CPE. Moreover, these methods showed similar sensitivity and specificity to molecular methods with the advantage of being accessible to most laboratories. The implementation of these confirmatory tests is particularly important in centers with CPE endemicity, where accurate and rapid infection-control measures, as well as isolation of colonized/infected patients, are a priority in order to limit the spread. Moreover, the tests are also useful in epidemiological studies collecting environmental isolates with complex phenotypes.

ACKNOWLEDGMENTS

The NDM-1-producing *K. pneumoniae* strain was kindly provided by Patrice Nordmann.

This study was partially funded by the Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI, RD12/0015). A.V. was supported by postdoctoral fellowship, Juan de la Cierva, from Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (JCI-2011-10863).

We declare no conflict of interests.

REFERENCES

1. Tenover FC, Canton R, Kop J, Chan R, Ryan J, Weir F, Ruiz-Garbajosa P, LaBombardi V, Persing DH. 2013. Detection of colonization by carbapenemase-producing Gram-negative bacilli in patients by use of the xpert mdr assay. *J Clin Microbiol* 51:3780–3787.
2. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P. 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 18:413–431.
3. Hrabák J, Chudáčkova E, Papagiannitsis CC. 2014. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect* 20:839–853.
4. Nordmann P, Poirel L. 2014. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 20:821–830.
5. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 18:1503–1507.
6. Pires J, Novais A, Peixe L. 2013. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 51:4281–4283.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. CLSI M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
8. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2015. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 5.0. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf.
9. Giske CG, Martinez L, Cantón R, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, Nordmann P, Wootton M, Miriagou V, Skov Simonsen G, Zemlickova H, Cohen-Stuart J, Gniadkowski M. 2013. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf.
10. Gijón D, Curiao T, Baquero F, Coque TM, Cantón R. 2012. Fecal carriage of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 50:1047–1050.
11. Gijón D, Morosini MI, García-Fernández S, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. 2014. Multiclonal spread of OXA-48 producers, including CG258 (ST11) *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae* in a VIM and KPC carbapenemase-endemic hospital and emergence in non-hospitalized patients. Abstr 24th Eur Congr Clin Microbiol Infect Dis, abstr P-1088. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Basel, Switzerland.
12. Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M, Gijón D, Pintado V, Valverde A, Baquero F, Morosini MI, Coque TM, Cantón R. 2013. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother* 68:2487–2492.
13. Dortet L, Bréchard L, Poirel L, Nordmann P. 2014. Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* using an updated version of the Carba NP test. *J Med Microbiol* 63:772–776.
14. García-Fernández S, Morosini M-I, Marco F, Gijón D, Vergara A, Vila J, Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. 2014. Evaluation of the eazplex Super-Bug CRE system for rapid detection of carbapenemases and ESBLs in clinical *Enterobacteriaceae* isolates recovered at two Spanish hospitals. *J Antimicrob Chemother* 70:1047–1050.
15. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. 2013. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4578–4580.
16. Pasterán F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, Albornoz E, Gomez S, Corso A. 2015. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 53:1996–1998.
17. Carvalhaes CG, Picao RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. 2010. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false-positive results. *J Antimicrob Chemother* 65:249–251.
18. Pasterán F, Méndez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. 2010. Controlling false-positive results obtained with the hodge and masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic acid. *J Clin Microbiol* 48:1323–1332.